

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PRODUCTION DES ESPÈCES RÉACTIVES DE L'OXYGÈNE ET
COMPOSITION LIPIDIQUE DES MEMBRANES MITOCHONDRIALES
COMME DÉTERMINANTS DE LA LONGÉVITÉ ET DE LA CAPACITÉ
D'ADAPTATION AU FROID CHEZ LES BIVALVES VÉNÉROIDES

THÈSE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR

DANIEL MUNRO

OCTOBRE 2014

À mes parents, Rachel et Hélió

La vie a coulé de nous à lui. Mouvante, toujours renouvelée comme la rivière.

Petit tourbillon tu nous fais de grands remous.

Tes éclats de soleil...de rire... sont imprévisibles... magnifique.

REMERCIEMENTS

Quand vient le temps de remercier tous ceux dont la présence, l'écoute et le support ont joué un rôle capital dans le succès d'une telle entreprise, la première chose qu'on se dit c'est : je vais en oublier c'est sûr. Si vous vous trouvez dans les oubliés, pardonnez-moi, je suis sûr que je vous ai mis dans mes remerciements personnels quelque part dans ma tête et mon coeur.

Le plus évident des remerciements qui nous vient en tête à la fin d'une thèse est pour le directeur. Merci, Pierre, pour tant de choses. Les idées de départ sur lesquelles tu m'as mis étaient géniales! Merci pour la confiance que tu m'as témoignée tout au long du projet, pour les discussions constructives autour des cafés que tu m'as payés. Un gros merci pour l'article sur l'autoxydation des NMI que tu m'as trouvé, ça a sauvé mes calculs d'IP. Merci pour tout l'argent que tu as investi en moi en congrès et frais de publication pour bien me positionner dans le domaine. Finalement, merci pour la vision constante de la façon de positionner tes étudiants pour la suite des choses qui caractérise ta supervision.

Merci à toi André (André Martel, Musée de la nature, Gatineau/Ottawa) pour m'avoir démarré dans la bonne direction avec les palourdes marines. Je ne pensais pas un jour avoir un codirecteur qui partage mon sport préféré!

Merci aux gens du labo. Nicolas Pichaud et Hélène Lemieux, vous m'avez initié à l'art de l'Oroboros...fascinant comme domaine! Le chapitre I n'aurait pas existé sans vous. Véronique Desrosier, merci pour l'assistance si attentionnée pour les mesures de production de H_2O_2 entre autres choses. Vincent Keimeid, ta présence au labo est

toujours positive et tes discussions fort à propos. Samuel, ta supervision pour le GC-FID a été très appréciée.

Un merci spécial à Richard Saint-Louis, les heures passées au labo et les nombreuses discussions de corridor ont porté fruit pour me former. Merci à Diane Bérubé pour l'assistance avec le GC-MS qui nous a donné tant de misère!!

Un gros merci à Édouard Kraffe pour le stage, la conférence et les nombreuses discussions TRÈS profitables pour ma connaissance des lipides. Le surf est difficile à Brest, mais j'ai eu du bon temps!

Merci aussi à Julien Thébault (UBO) pour l'accès au laboratoire et l'aide au développement des mesures de sclérochronologie.

Enfin, les derniers seront les premiers dit-on, merci à ma complice complémentaire de tous les jours, Rachel. Ton support émotif, ta capacité à me replacer les idées quand ça dérape et ton intérêt soutenu pour un domaine qui n'est même pas le tien...tout ça a été de l'or pour moi! Merci aussi pour l'assistance dans la prise de données lipides. Mais surtout, merci pour ton épaule au retour de mon premier congrès quand j'ai su que je devais tout recommencer mes analyses lipidiques.

AVANT PROPOS

La longévité et son corolaire, le vieillissement, sont des sujets de recherche qui suscitent la fascination et sont porteurs de réflexions fondamentales sur la nature du phénomène de la vie. En ce sens, ils s'inscrivent comme un axe central de la recherche en biologie visant à décrire les phénomènes naturels. Mais les retombées de ces études semblent sous-estimées par le domaine de la médecine qui dirige presque tout le financement vers la recherche sur des maladies de vieillesse bien ciblées. Pourtant, dans leurs derniers retranchements, une limite permanente des recherches sur les maladies de vieillesse est l'incapacité de distinguer le phénotype de la maladie de celui du vieillissement sain. Malgré ces justifications évidentes la recherche sur le vieillissement fondamental est très peu financée. Aussi, ni les théories évolutives du vieillissement ni les théories physiologiques et leur mécanismes effecteurs ne sont actuellement bien établies. Mais cela reflète possiblement plus que le manque de financement. Le vieillissement (ou sénescence) est un phénomène au carrefour des limites physiologiques fondamentales imparties par la nature de la cohabitation de deux types d'organismes unicellulaires ayant fusionné pour former les cellules eukaryotes. L'organisme résultant est capable de perdurer dans le temps d'une façon spectaculaire comparativement aux organismes unicellulaires qui en sont à l'origine. Par contre, la synergie restante de ces deux organismes dans l'organisme eukaryote complexifie de beaucoup les mécanismes physiologique à l'oeuvre. La recherche des dernières année suggère que l'un de ces deux organismes originaux soit caractérisé par une plus faible capacité intrinsèque à perdurer dans le temps et qu'il puisse ainsi

agir comme une limite proximale à la longévité de l'organisme eukaryote complet. Il s'agit de l'alpha-protéobactérie maintenant devenu mitochondrie.

Cette thèse de doctorat est divisée en quatre chapitres correspondants à quatre articles scientifiques publiés ou soumis. Les références sont regroupées en une seule liste à la fin de la thèse par souci d'économie d'espace. Les travaux de recherche de ce projet ont été financés par les subventions accordées à Pierre Blier par le CRSNG. Ma subsistance au cours de ces années a été supportée par une bourse de doctorat en recherche du CRSNG (trois premières années), une bourse FONCER du Réseau Aquaculture Québec (quatrième année) et les fonds de recherche de Pierre Blier pour la fin.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES TABLEAUX.....	XIII
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	XV
RÉSUMÉ	XVII
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
Les théories évolutives du vieillissement : pourquoi vieillit-on?	1
La théorie du vieillissement par le stress oxydant mitochondrial	3
Mécanismes pro- vs antioxydants	5
Les études comparatives sur les quatre niveaux de modulation du stress oxydant.....	10
L'ADN mitochondrial comme cible des ERO	22
Les problématiques liées à l'approche comparative en physiologie du vieillissement	26
Les bivalves comme modèle biogérontologique.....	30
Mesurer la production d'ERO par les mitochondries isolées.	34
Mécanismes modulateurs de la production des ERO : vertébrés vs bivalves	38
Mesurer l'indice de peroxydation membranaire	41
Remodelage lipidique membranaire induit par le froid	47
Objectifs généraux et spécifiques	52
CHAPITRE I	
LOW HYDROGEN PEROXIDE PRODUCTION IN MITOCHONDRIA OF THE LONG-LIVED <i>ARCTICA ISLANDICA</i> : UNDERLYING MECHANISMS FOR SLOW AGING	59
1.1 Résumé	60
1.2 Abstract.....	60
1.3 Introduction.....	61

1.4	Experimental procedures.....	65
1.4.1	Bivalve collection and care	65
1.4.2	Isolation of mitochondria	65
1.4.3	Mitochondrial hydrogen peroxide production	66
1.4.4	Oxygen consumption	67
1.4.5	Enzymatic activity.....	68
1.4.6	Statistical analysis	68
1.5	Results	69
1.5.1	Size, age, and normalization	69
1.5.2	H ₂ O ₂ production rate of isolated mitochondria	70
1.5.3	Oxygen consumption and enzymatic activity	73
1.5.4	Activity of the alternative oxidase	77
1.6	Discussion	79
1.6.1	Hydrogen peroxide production	79
1.6.2	Mechanism for reduced hydrogen peroxide production rate	83
1.6.3	Conclusion and perspectives	86
1.7	Acknowledgement.....	86
CHAPITRE II		
THE EXTREME LONGEVITY OF <i>ARCTICA ISLANDICA</i> IS ASSOCIATED		
WITH INCREASED PEROXIDATION RESISTANCE IN MITOCHONDRIAL		
MEMBRANES.....		
2.1	Résumé.....	88
2.2	Abstract	88
2.3	Introduction	89
2.4	Experimental procedures.....	93
2.5	Results	95
2.5.1	Preliminary results and general lipid composition.....	95
2.5.2	Longevity and peroxidation sensitive fatty acids.....	100
2.5.3	Non-methylene interrupted fatty acids.....	106
2.5.4	Plasmalogens.....	107
2.6	Discussion	108

2.6.1 Pattern of lipid remodelling with increasing longevity in bivalves.....	108
2.6.2 Mitochondrial membrane vs. Other cell membranes.....	110
2.6.3 Bivalves vs. Mammals.....	111
2.6.4 Conclusion and perspectives.....	114
2.7 Acknowledgements.....	115

CHAPITRE III

AGE, DIET AND SEASON DO NOT AFFECT LONGEVITY RELATED DIFFERENCES IN PEROXIDATION INDEX BETWEEN <i>S. SOLIDISSIMA</i> AND <i>A. ISLANDICA</i>	117
--	-----

3.1 Résumé	118
3.2 Abstract.....	118
3.3 Introduction.....	119
3.4 Method.....	123
3.4.1 Animal care and schedule of dissection.....	123
3.4.2 Biological fractions isolation.....	124
3.4.3 Lipid analysis.....	125
3.4.4 Age determination	126
3.4.5 Statistics.....	126
3.5 Results	127
3.6 Discussion.....	133
3.7 Acknowledgements.....	138

CHAPITRE IV

COLD-INDUCED MEMBRANE LIPID REMODELLING IS NOT EXPRESSED DURING QUIESCENCE IN THE BIVALVE <i>MERCENARIA MERCENARIA</i>	139
---	-----

4.1 Résumé	140
4.2 Abstract.....	141
4.3 Introduction.....	142
4.4 Material and methods	145
4.4.1 Animals.....	145
4.4.2 Mitochondrial isolation.....	146
4.4.3 Lipoxidation.....	147

4.4.4 Lipid analysis	147
4.4.5 Statistical analysis	148
4.5 Results	149
4.6 Discussion	161
4.6.1 FA remodelling during quiescence in <i>M. mercenaria</i>	161
4.6.2 HVA or HUFA increase?	165
4.7 Acknowledgements	167
CONCLUSION GÉNÉRALE	169
La relation inverse ERO-longévité	172
La relation inverse IP-longévité	176
L'état actuel de la théorie du vieillissement par le stress oxydant mitochondrial	184
Évidences de compromis évolutifs : support à la pléiotropie antagoniste	187
La quiescence facultative induite par le froid chez <i>M. mercenaria</i>	191
Perspectives	193
Perspectives pour la mise en évidence d'une relation inverse ERO-longévité	195
Perspective pour la poursuite de la recherche sur la relation inverse entre la susceptibilité à l'oxydation des membranes et la longévité	199
Synergie entre production des ERO et IP	201
ANNEXE A	
SUPPORTING INFORMATION – CHAPTER I	205
ANNEXE B	
SUPPORTING INFORMATION – CHAPITRE II	217
ANNEXE C	
SUPPORTING INFORMATION – CHAPITRE III	221
RÉFÉRENCES	225

LISTE DES FIGURES

Figure 0.1 Origine des espèces réactives de l'oxygène (ERO) primaires.....	6
Figure 0.2 Exemple de produit de l'oxydation d'une base guanosine de l'ADN et d'un acide aminé arginine d'un squelette protéique.....	7
Figure 0.3 Peroxydation de l'acide arachidonique (20:4 Δ^{8-14}) par un radical hydroxyle.	17
Figure 0.4 Aldéhydes réactifs issus de la peroxydation des AGPI formant un adduit à un résidu lysine d'une protéine.	18
Figure 0.5 Section de la phylogénie des mammifères.	28
Figure 0.6 Coupe transversale d'une coquille de Quahog nordique (<i>A. islandica</i>) de 104 ans.	31
Figure 0.7 Taxonomie, taille et longévité des cinq espèces formant le modèle comparatif de bivalves marins de la sous-classe hétérodontes.	32
Figure 0.8 Système de transport des électrons de la membrane interne des mitochondries de bivalves.	35
Figure 0.9 Structure d'un acide gras « methylene interrupted » typique des vertébrés et des quatre acides gras non-methylene interrupted (NMI) les plus communs chez les bivalves.	42
Figure 0.10 Forme standard et forme plasmalogène de la phosphatidyléthanolamine.	45
Figure 0.11 Structure d'un méthyle ester d'acide gras (MEAG) et d'un diméthyle acétal (DMA) de 18 carbones de longueur de chaîne.	46
Figure 1.1 Hydrogen peroxide production of isolated mantle mitochondria.	71
Figure 1.2 Free-radical leak expressed as the percent of oxygen consumption diverted to the production of hydrogen peroxide.....	73
Figure 1.3 Oxygen consumption of mantle mitochondria.	75

Figure 1.4 Enzymatic activities of the ETS components normalized with citrate synthase (A) and complex IV (B) activity..	77
Figure 2.1 Key lipid composition indicators in mitochondrial membrane phospholipids (black bars) and cellular debris phospholipids (white bars) of the five bivalve species.	101
Figure 2.2 Relationships between % docosahexaenoic acid (A), % peroxidation-sensitive polyunsaturated fatty acids (B), and peroxidation index (C) and maximum reported longevity.	103
Figure 2.3 Carbon chain composition of mitochondrial (A) and cellular debris (B) phospholipids from bivalve gills.	104
Figure 3.1 Relationship between age (A), length (B) and wet weight (C), and the peroxidation index (PI) of gill membranes in <i>S. solidissima</i> .	128
Figure 3.2 Effects of normal mild winter starvation followed or not by early spring supplementation of microalgae on markers membrane lipid composition in gills of <i>S. solidissima</i> and <i>A. islandica</i> .	130
Figure 3.3 Cold induced lipid remodelling in gills of <i>S. solidissima</i> and <i>A. islandica</i> .	132
Figure 4.1 Markers of lipoxidation in gills of <i>M. mercenaria</i> at three time points of the year.	151
Figure 4.2 Sums and indexes for carbon chain analysis of gill mitochondrial (filled symbols) and non-mitochondrial (open symbols) PL for three marine bivalve species (order Veneroida).	159
Figure A.1 Example of a substrate-uncoupler-inhibitor-titration used for the acquisition of oxygen consumption data.	210
Figure A.2 Example of a substrate-uncoupler-inhibitor-titration used for measuring of AOX activity.	211

LISTE DES TABLEAUX

Table 1.1 Life history traits of the three species investigated.....	70
Table 2.1 Fatty acid and DMA composition (mol%) of phospholipids from gill mitochondria.	96
Table 2.2 Fatty acid and DMA composition (mol%) of phospholipids from gill cell debris.....	98
Table 4.1 Life history traits of the three species investigated.....	150
Table 4.2 Fatty acid and dimethyl acetals (DMA) composition (mol%) of phospholipids from gill mitochondria.....	153
Table 4.3 Fatty acid and DMA composition (mol%) of phospholipids from gill non-mitochondrial membranes.....	156
Table A.1 Parameters of statistical test (ANOVA and GLMM) that preceded the post hoc test used to produce <i>P</i> -values presented in the figures of the article. ...	215
Table C.1 Parameters of statistical test (ANCOVA and ANOVA) that preceded the test of the effect of covariates or post hoc test used to produce <i>P</i> -values presented in the figures.	221

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

8-oxodg	8-oxo désoxyguanosine
AA	Antimycine A
ADH	Acide docosa-hexaénoïque
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNmt	ADN mitochondrial
ADNn	ADN nucléaire
ADP	Adénosine diphosphate
AEP	Acide eicosapentaénoïque
AG	Acide gras
AGHI	Acide gras hautement insaturé
AGMI	Acides gras monoinsaturés
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AOX	Oxydase alternative
ATP	Adénosine trisphosphate
CAT	Catalase
CE	Convergence des électrons
CML	Carboxyméthyl lysine
CPG-SM	Chromatographie sous phase gazeuse – spectrométrie de masse
Cu/ZnSOD	SOD associée au cuivre/zinc (forme cytosolique)
DHA	Docosa-hexaénoïque acid
DNP	2,4-dinitrophénol (découpleur de la membrane mitochondriale)
EPA	Eicosapentaénoïque acid
ERO	Espèce réactive de l'oxygène
FCCP	Carbonilcyanide <i>p</i> -trifluorométhoxyphénylhydrazone (découpleur de la membrane mitochondriale)
FRL	Free radical leak (pourcentage de l'oxygène consommé déviés vers la production des ERO)
Glu	Glutamate
GPx	Glutathione peroxydase
HUFA	Highly unsaturated fatty acid
HVA	Homeoviscous adaptation
IP	Indice de peroxydation
ISMER	Institut des sciences de la mer
L•	Alkyl lipidique radicalaire

LH	Forme lipidique non oxydée
LMR	Longévité maximale rapportée
LOO [•]	Peroxyl lipidique
LOOH	Hydroperoxyde lipidique
Mal	Malate
MDA	Malondialdéhyde
MEAG	Methyl ester d'acide gras
MnSOD	SOD associée au manganèse (forme mitochondriale)
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NMI	Non-methylene interrupted fatty acid
PAE	Passage avant des électrons
PC	Phosphatidyl choline
PE	Phosphatidyl éthanolamine
PIE	Passage inversé des électrons
PL	Phospholipid
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
PO ₂	Pression partielle d'oxygène
SHAM	Acide salicylhydroxamique
<i>sn-x</i>	Serial numbering-x
SOD	Superoxide dismutase
STE	Système de transport des électrons
TBARS	Thiobarbituric acid reactive species
TMPD	N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride

RÉSUMÉ

Les processus physiologiques effecteurs du vieillissement et sur lesquels opère la sélection naturelle pour augmenter ou diminuer la longévité des espèces sont mal connus. L'hypothèse du vieillissement par le stress oxydant mitochondrial propose que les mitochondries jouent un rôle clé en produisant les espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui peuvent attaquer et dénaturer les macromolécules fonctionnelles et structurales de la cellule. La sénescence serait particulièrement liée à l'accumulation de mutations et de délétions à l'ADN mitochondrial causées par les ERO. Cette thèse teste certaines prédictions de la théorie par l'approche comparative en utilisant le modèle biogerontologique émergent des bivalves marins. L'emphase est mise sur l'espèce possédant la plus grande longévité connue parmi les métazoaires, la palourde marine *Arctica islandica* (longévité = 507 ans).

Le chapitre I de cette thèse a pour objectif de démontrer s'il existe une association inverse entre le taux de production de base des ERO par les mitochondries d'une espèce et sa longévité. La comparaison est faite entre *A. islandica* et les palourdes *Spisula solidissima* et *Mya arenaria*, dont les longévités respectives sont de 37 et 28 ans. En accord avec la théorie, les résultats montrent une moindre production d'ERO pour les mitochondries d'*A. islandica* relativement à celles de *Mya arenaria* (longévité = 28 ans) et de *Spisula. solidissima* (longévité = 37 ans). Cette tendance s'est révélée dans la vaste majorité des conditions de métabolisme mitochondrial testées. Ceci inclus le passage avant des électrons obtenu par l'utilisation des substrats du complexe I, le passage inverse des électrons obtenu par l'utilisation du succinate pour alimenter le système de transport des électrons au niveau du complexe II, et la convergence des électrons (avec ou sans ADP) obtenu par l'utilisation simultanée des substrats du complexe I et II. La tendance reste la même que la production des ERO soit normalisée par l'activité de la citrate synthase (bon marqueur du volume mitochondrial), par la cytochrome C oxydase (bon marqueur des capacités OXPHOS), ou par la consommation d'oxygène (Free radical leak). De plus,

cette moindre production d'ERO chez *A. islandica* ne semblent pas être obtenue au détriment de la capacité de production d'ATP. Elle serait plutôt le résultat d'une activité moindre du complexe I au sein du système de transport des électrons de la mitochondrie tel que proposé précédemment pour les endothermes (rat et pigeon). Ce chapitre propose que la faible activité relative observée pour le complexe II chez *A. islandica* puisse également participer à soulager la production d'ERO en limitant l'entrée des électrons par rapport aux capacités en aval du système de transport des électrons.

Le Chapitre II a pour objectif de démontrer s'il existe une corrélation inverse entre la susceptibilité des membranes biologiques à la peroxydation lipidique et la longévité, tel que proposée par la « Membrane pacemaker theory of aging ». Cette hypothèse suggère qu'une plus grande incorporation d'acides gras polyinsaturés (AGPI) dans les phospholipides membranaires entraîne une plus grande susceptibilité à l'oxydation par les ERO (plus grand indice de peroxydation, IP). À son tour, le taux plus élevé de peroxydation lipidique entraînerait une plus grande production d'aldéhydes réactifs toxiques capables de produire des mutations et délétions à l'ADN. Ce chapitre présente une comparaison entre la composition lipidique des membranes mitochondriales et cellulaires de cinq espèces de bivalves, incluant *A. islandica*. L'IP s'est révélé négativement corrélé à la longévité parmi les cinq espèces, ce qui supporte la « Membrane pacemaker theory of aging » pour la première fois dans une comparaison interspécifique chez les invertébrés. De plus, la corrélation inverse IP-longévité s'est révélée plus prononcée dans le cas des membranes mitochondriales, ce qui est en accord avec un rôle central des mitochondries dans le processus du vieillissement.

Le chapitre III examine les influences du remodelage lipidique des membranes induit par le froid, de la diète et de l'âge des individus sur la composition lipidique et l'IP des membranes d'*A. islandica* et de *S. solidissima*. Les résultats montrent que le froid, tout autant que la supplémentation diététique, est susceptible de faire augmenter l'IP, mais l'âge n'aurait pas d'effet. L'IP serait donc influencé par l'environnement d'une espèce, mais les différences absolues entre celles-ci seraient maintenues à l'intérieur de chaque milieu, et ce, indépendamment de l'âge.

Le chapitre IV poursuit un aspect de la recherche sur le remodelage lipidique induit par le froid. Les études précédentes avaient montré que les ectothermes qui restent actifs durant la saison froide augmentent leur teneur en acides gras insaturés et/ou hautement insaturés membranaire alors que ceux qui entrent en dormance n'opèrent

aucun changement. Le chapitre montre que la quiescence facultative observée chez *M. mercenaria* lorsque la température descend sous les 6-7 °C s'accompagne d'une absence de remodelage lipidique bien que l'espèce opère cette acclimatation aux températures plus élevées. Il montre de plus que la quiescence induite par le froid s'accompagne d'une recrudescence du stress oxydant ce qui pourrait expliquer la mortalité hivernale des individus de cette espèce dans la partie nord de son aire de distribution.

Mots clés : Théorie du vieillissement par le stress oxydant mitochondrial, bivalves, système de transport des électrons, lipides membranaires, longévité, température, mollusques, bivalves marins.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les théories évolutives du vieillissement : pourquoi vieillit-on?

Le vieillissement est une déperdition graduelle de la capacité des organes à accomplir leurs fonctions physiologiques, et par conséquent, de la capacité de l'organisme entier à faire face à un stress physiologique. On distingue la sénescence comme étant la composante fondamentale du vieillissement par opposition aux pathologies et aux traumatismes avec lesquels elle peut toutefois entrer en interaction. La sénescence présente un phénotype universel chez les animaux supérieurs (métazoaires) i.e. elle est endogène, progressive, irréversible et délétère, et son occurrence est ubiquitaire dans les tissus somatiques. En absence de causes de mortalité brutale ou de pathologie, la sénescence devrait impartir une limite ultime à la longévité par le fait d'exacerber la fragilité physiologique. Il est raisonnable de suggérer que les individus qui établissent les records de longévité sont ceux qui ont réussi à éviter au mieux toutes pathologies. Leur durée de vie nous permet alors d'estimer avec une certaine précision la vitesse de la sénescence au sein de l'espèce. Le fait que la durée de vie diffère grandement entre les espèces, passant par exemple de moins de 30 jours chez les mouches à fruit (*Drosophila melanogaster*) à plus de 500 ans chez la palourde marine *Arctica islandica* (Butler et al. 2013; Ridgway & Richardson 2011), soulève tout d'abord une interrogation quant aux pressions évolutives qui agissent pour moduler la vitesse de sénescence. Trois théories évolutives du vieillissement sont actuellement considérées. La théorie de « l'accumulation de mutations au potentiel délétère tardif » propose que l'assouplissement de la pression de la sélection

naturelle qui accompagne l'avancée en âge résulte dans l'accumulation des mutations néfastes sur des gènes qui jouent un rôle à un âge avancé. La théorie de la « pléiotropie antagoniste » suggère que des allèles qui causent le vieillissement sont sélectionnés dans la mesure où ils confèrent un avantage compétitif en bas âge qui surpasse les effets négatifs en âge avancé pour une niche écologique donnée. Par exemple, une espèce qui vit plus longtemps pourrait ajuster le fonctionnement des mitochondries afin de diminuer le taux de production des radicaux libres au dépend de la capacité de production d'ATP par unité de masse. Enfin, la théorie du « soma jettable » propose qu'il puisse être avantageux de prioriser l'utilisation de l'énergie disponible pour les fonctions physiologiques assurant le succès reproducteur (à court terme) au détriment de celles assurant la pérennité des tissus somatiques afin d'améliorer sa compétitivité relative au sein de la niche écologique. Par exemple, les petites chauves-souris brunes (*Myotis lucifugus*, longévité max. = 34), qui vivent plus longtemps que les souris communes (*Mus musculus*, longévité max. = 4 ans), devraient allouer relativement plus d'énergie à l'élimination des agrégats de protéines oxydées au sein des cellules et relativement moins à la croissance de leurs fœtus.

Alors que la théorie de l'accumulation de mutations est dite non adaptative, celles de la pléiotropie et du soma jettable sont dites adaptatives. Bien que les deux types de théories ne soient pas mutuellement exclusifs, la théorie de l'accumulation de mutations demande à ce que la longévité existe déjà. Les théories adaptatives, elles, suggèrent un mécanisme à l'origine des différences de longévité qui serait en phase avec la nature de la niche écologique. Une récente tentative de modélisation suggère une plus forte importance relative des phénomènes adaptatifs dans la détermination de la durée de vie des espèces (Dańko et al. 2012). Une distinction très importante est que les théories adaptative prédisent des mécanismes beaucoup plus circonscrits au niveau physiologique et permettent de formuler des hypothèses précises pouvant être testées. Des compromis entre avantage à court terme et désavantage à long terme

ainsi qu'entre les performances en jeune âge et la pérennité de l'organisme devraient se refléter dans des fonctions physiologiques précises susceptibles d'affecter les performances et la préservations de l'organisme. La recherche de ce type de modulateur de la longévité animale est à la base des théories physiologiques du vieillissement. L'objectif principal de cette thèse de doctorat est de tester les prédictions de l'une de ces théories, la « théorie du vieillissement par le stress oxydant mitochondrial ».

La théorie du vieillissement par le stress oxydant mitochondrial

Bien qu'un grand nombre de théories sur les mécanismes physiologiques du vieillissement soit proposé, il est étonnant de constater qu'aucune de celles-ci ne soit proche de faire l'unanimité. La théorie du vieillissement par le stress oxydant mitochondrial est celle qui trouve le plus d'appuie dans les études comparatives et expérimental. Elle souffre néanmoins de contre exemples importants, si bien que plusieurs chercheurs n'y réfèrent qu'en tant qu'hypothèse (Buffenstein et al. 2008; Sanz et al. 2006).

La théorie du vieillissement par le stress oxydant trouve son origine chez Harman (1956) qui y référerait alors en tant que « théorie radicalaire du vieillissement ». La succession de noms utilisés par la suite évoque les nombreux développements qui ont caractérisé cet ensemble d'explications. Dans la forme originale de la théorie, Harman propose simplement que la présence du dioxygène en milieu biologique conduise à la génération non catalysée (spontanée) de radicaux libres délétères qui attaquent et dégradent les macromolécules structurales et fonctionnelles telles que les protéines, les lipides et l'ADN. Bien que cette approche puisse déjà bien rendre compte du caractère endogène, progressif et délétère de la sénescence, les détails des processus par lesquels les radicaux libres provoquent l'oxydation des molécules du vivant ainsi que les défenses de l'organisme ont depuis largement complexifié notre vision. Ainsi, un grand nombre d'enzymes et de molécules antioxydantes a été mis en

évidence, suggérant que, dans une certaine mesure, les effets néfastes des radicaux libres peuvent et doivent être tempérés. Des systèmes de réparation des macromolécules oxydés (ADN, protéines) ont également été mis en évidence, révélant une deuxième ligne d'intervention. De plus, on a découvert que les radicaux libres peuvent donner naissance à un grand nombre d'espèces moléculaires réactives non radicalaires. Ces espèces secondaires, peuvent elles aussi endommager les macromolécules biologiques ou encore reformer des radicaux libres ultérieurement plus loin dans l'environnement cellulaire (Halliwell & Gutteridge 1999). Pour ces raisons, le terme espèces réactives de l'oxygène (ERO) a ainsi été introduit pour inclure à la fois les radicaux libres au sens strict et leurs dérivés réactifs. Pour tenir compte du rôle de chacun de ces intervenants dans la balance entre les mécanismes pro et anti-oxydants, nous parlons aujourd'hui de stress oxydant plutôt que simplement de production de radicaux libres. La théorie (hypothèse) a donc changé de nom pour devenir la « théorie du vieillissement par le stress oxydant ». Selon cette vision, les espèces animales ayant la plus grande longévité seraient caractérisées par un niveau de stress oxydant de base moins élevé. La contribution majeure des mitochondries comme source principale d'ERO, et plus tard en tant que cible principale de l'attaque par les ERO a finalement conduit à l'expression plus précise de « théorie du vieillissement par le stress oxydant mitochondrial ». Selon cette théorie, l'accumulation des dommages au niveau moléculaire ferait périliter le fonctionnement cellulaire et causerait la sénescence des tissus. Cette théorie est beaucoup plus complexe étant donné la diversité des intervenants susceptibles de faire varier le taux d'accumulation de ces dommages. Les trois premiers chapitres de cette thèse représentent un test de cette hypothèse par une approche comparative interspécifique où la prédiction est une corrélation inverse entre la longévité et la production des ERO d'origine mitochondriale.

Mécanismes pro- vs antioxydants

La mitochondrie est la source de plus de 95% des ERO produites au niveau cellulaire en condition physiologique. L'ensemble des ERO d'origine mitochondriale est dérivé de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), lequel est produit par le système de transport des électrons (STE) de la membrane interne des mitochondries. La vaste majorité des anions superoxydes sont dismutés en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) (Fig. 1). Dans la majorité des cas, le H_2O_2 est neutralisé en eau par les défenses antioxydantes. Comme le montre la figure 0.1, un certain pourcentage suit toutefois la séquence de Haber-Weiss pour former le radical hydroxyle (OH^{\bullet}). Cette conversion est beaucoup plus rapide en présence d'ions métalliques qui permettent la réaction de Fenton. Au sens strict, les radicaux libres sont les espèces moléculaires qui possèdent un électron non apparié sur le dernier orbital de la molécule, lequel confère un caractère hautement réactif. Sur la figure 0.1, ces espèces moléculaires sont représentées avec un point noir qui indique la présence de l'électron non apparié.

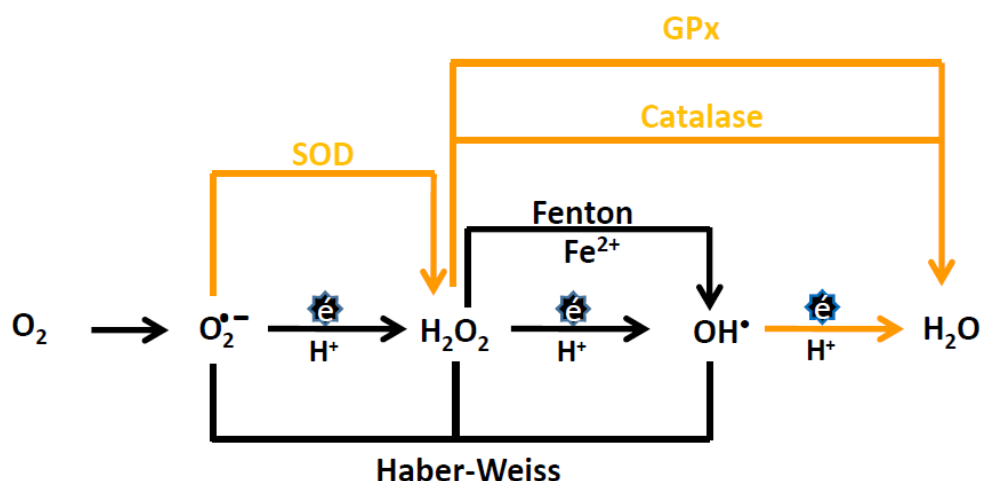


Figure 0.1 Origine des espèces réactives de l'oxygène (ERO) primaires. L'anion superoxyde peut suivre une suite de Haber-Weiss impliquant ou non une réaction de Fenton pour produire le radical hydroxyle hautement réactif. Les radicaux libres sont représentés avec un point qui symbolise l'électron non apparié sur une orbitale. En jaune, les chemins de détoxification enzymatique. SOD = superoxide dismutase, GPx = glutathione peroxidase. Adapté de Borg (1993).

Ainsi, l'anion superoxyde, et particulièrement le radical hydroxyle, sont des espèces radicalaires très réactives; elles peuvent attaquer et dénaturer les macromolécules et leur faire perdre leur fonctionnalité. L'oxydation des bases de l'ADN interfère avec la réplication de l'ADN et peut mener à l'appariement inapproprié des bases produisant des mutations qui altèrent la synthèse protéique (Halliwell & Gutteridge 1999). Les ERO peuvent provoquer l'oxydation des chaînes latérales d'acides aminés des protéines, la formation de pont disulfure protéine-protéine, et l'oxydation du squelette protéiné provoquant la fragmentation des protéines. La figure 0.2 montre un exemple d'oxydation de l'ADN et des protéines en prenant l'exemple d'une base guanosine (la plus sensible à l'oxydation) et d'un acide aminé arginine.

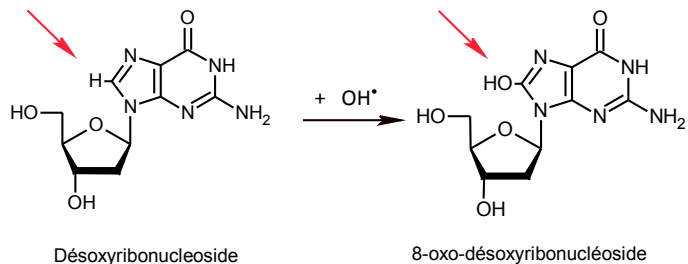
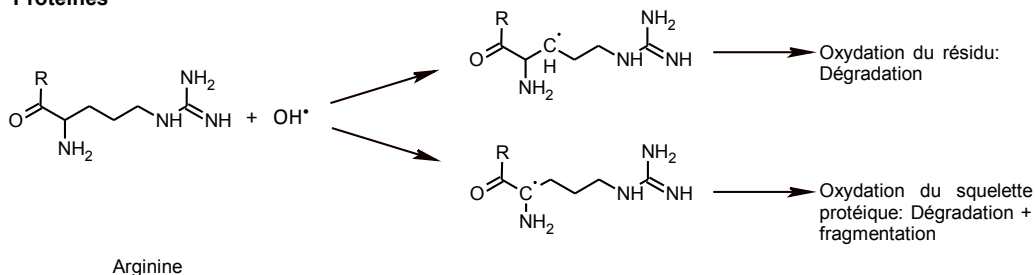
ADN**Protéines**

Figure 0.2 Exemple de produit de l'oxydation d'une base guanosine de l'ADN et d'un acide aminé arginine d'un squelette protéique.

Étant de petite taille et non-chargé, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) peut, quant à lui, traverser la membrane interne des mitochondries. Relativement stable, il peut circuler dans le cytosol un certain temps avant que la réaction de Fenton ne donne lieu à la génération d'un radical hydroxyle pouvant attaquer une cible distante de la mitochondrie. Mais le radical hydroxyle peut aussi réagir avec des espèces moléculaires simples pour former un grand nombre d'ERO secondaires toutes plus ou moins réactives et capables de conduire à la dégradation du fonctionnement cellulaire (non représenté sur la figure 0.1).

Une première ligne de défense contre l'attaque chimique par les ERO est en partie constituée des enzymes antioxydantes représentées sur la figure 0.1. La dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène par la superoxyde dismutase (SOD)

est une réaction simple et rapide. La forme associée au cuivre-zinc (Cu/ZnSOD) est présente dans le cytosol tandis que la forme associée au manganèse (MnSOD) est présente dans la matrice mitochondriale. Les systèmes impliqués dans la détoxification du H_2O_2 sont beaucoup plus nombreux et complexes. La catalase (CAT) permet la conversion du H_2O_2 en eau de façon très efficace relativement aux autres systèmes lorsque celui-ci est en grande concentration. Lorsque les taux de H_2O_2 sont aux faibles concentrations normalement rencontrées en conditions physiologiques, les systèmes de peroxydases couplées à un co-facteurs sont plus efficaces. La glutathione peroxydase utilise le glutathione réduit pour neutraliser le H_2O_2 en eau. Le glutathione ainsi oxydé est réduit à nouveau par la glutathione réductase. Les thioredoxines réduites peuvent neutraliser le H_2O_2 en eau directement ou servir de co-facteur pour jouer le même rôle en association avec les peroxiredoxines. Les thioredoxines ainsi oxydées sont ensuite réduites à nouveau par la thioredoxine reductase. Les deux réductases sont dépendantes de la production de NADH/NADPH pour réduire leur cofacteur, elle sont donc à l'arrêt dans les mitochondries non-alimentées en substrats. À ces systèmes enzymatiques s'ajoutent les antioxydants moléculaires hydrosolubles de faible masse tels que l'acide ascorbique (vitamine C) ou liposolubles tels que l'alpha-tocophérol (Vitamine E).

Une deuxième ligne de défense comprend les mécanismes de réparation ou d'excision/remplacement des composés oxydés. Par exemple, la polymérase à ADN β , bien caractérisée chez les eucaryotes, mais aussi la polga mitochondrial sont impliquées sont seulement dans la synthèse de l'ADN, mais aussi dans sa réparation. Elles peuvent exciser et remplacer des paires de bases oxydées telles que la 8-oxo-désoxy-guanosine et interviennent dans les processus de réparation de l'ADN impliquant des cassures doubles brins. Les méthionines sulfoxyde réductases permettent quant à elles de restaurer la fonction des protéines oxydées sur leurs résidus méthionines. Les résidus cystéines peuvent également être oxydés, formant des ponts disulfure entre protéines (PSSP), entre résidus sur une même protéine, ou

entre un résidu cystéine et un glutathion, (PSSG). Ces modifications sont réversibles et leur proportion est influencée par l'environnement redox, lequel est largement établi par l'état redox du couple GSH : GSSG (Schafer & Buettner 2001). Les mécanismes de réparation n'étant pas infaillibles, l'accumulation de protéines carbonylées en agrégats non dégradables par les protéases, l'accumulation de lipides oxydés non dégradables (e.g. lipofuscine) et l'accumulation de mutations ponctuelles et de délétion au sein de l'ADN codant sont des processus qui ont lieu continuellement. Cette accumulation de déchets et de bris représente une partie du processus du vieillissement au niveau cellulaire.

Le vitesse d'accumulation des dommages oxydatifs au niveau moléculaires peut, de plus, être tempérés par l'utilisation de composantes intrinsèquement moins oxydables pour la synthèse des macromolécules (Pamplona & Barja 2011). Par exemple, les bases guanines de l'ADN sont plus facilement oxydables que les autres et leur substitution synonyme au cours de l'évolution peut permettre de diminuer le taux de mutations. Les résidus méthionines sont aussi plus facilement oxydables et l'épuration de ces acides aminés au sein des protéines en augmente la résistance aux ERO. L'exemple le plus détaillé reste celui du remplacement d'acides gras polyinsaturés (AGPI) dans les phospholipides membranaires par des acides gras (AG) à faible niveau d'insaturation moins susceptibles à la peroxydation lipidique.

À la vue de l'ensemble de ces mécanismes, l'évaluation de la théorie du vieillissement par le stress oxydant mitochondrial, demande donc de considérer quatre grandes lignes de changement. De façon indépendante les uns des autres, ces changements pourraient réduire le taux d'accumulation des dommages moléculaires d'origine oxydative considérés sous-jacents à la sénescence. Ainsi 1) le taux de base de production des ERO par les mitochondries pourrait être diminué, 2) la capacité des défenses antioxydantes (enzymatiques et moléculaires) pourraient être augmentées, 3) les capacités des mécanismes de réparation des dommages oxydatifs pourraient être

accrues, 4) les biomolécules (ADN, protéines, pourraient être constituées de composantes de meilleure résistance intrinsèque à l'oxydation. Depuis la formulation de la théorie, chacun de ces niveaux de modulation a fait l'objet de recherches pour tenter de valider la théorie.

Les études comparatives sur les quatre niveaux de modulation du stress oxydant

L'approche comparative a largement été utilisée pour tenter de mettre en évidence des adaptations à chacun des niveaux de modulation du stress oxydant. Contrairement aux attentes, les capacités antioxydantes ne semblent pas corrélées à la longévité des espèces (Sanz et al. 2006). Hulbert et al. (2007) ont révisé 12 études comparatives sur divers organes de vertébrés et chez la mouche drosophile. Les conclusions ne supportent pas l'existence de corrélation entre la longévité et le niveau d'activité des défenses antioxydantes enzymatiques ou la teneur en antioxydants moléculaires. Au contraire, environ la moitié de ces études trouvent une corrélation négative avec la longévité des espèces tandis que l'autre moitié ne trouve pas de relation. L'analyse de 12 études sur l'augmentation des défenses antioxydantes enzymatiques ou moléculaires par manipulation de diète ou par approche pharmacologique n'est pas beaucoup plus convaincante. Si une diminution des causes de mortalité précoces a été trouvée dans plusieurs cas, l'effet sur la longévité maximale n'est toutefois significatif que pour deux études sur les douze (révisé dans Hulbert et al., 2007). Les mêmes auteurs ont également révisé 20 études de manipulation transgéniques visant la surexpression ou le knockout de gènes codant pour une enzyme antioxydante. Curieusement, le knockout décroît la longévité plutôt que de l'augmenter, et la surexpression ne l'augmente pas. Ainsi, en définitive, il semble que les défenses antioxydantes soient importantes pour l'état de santé général et la prévention des pathologies, mais restent très peu associées à la vitesse de sénescence des organismes étudiés.

Les études visant à évaluer les capacités des mécanismes de réparation sont plus complexes à effectuer et donc moins nombreuses et plus récentes. Les résidus méthionine oxydés des protéines peuvent être réparés par la méthionine sulfoxyde réductase. Le knockout de cet enzyme augmente la teneur en protéines carbonylées et diminue la longévité maximale chez les souris (Moskovitz 2005). À l'inverse, la surexpression de cette enzyme augmente la longévité maximale chez la drosophile (Ruan et al. 2002). Par contre, la mesure du niveau d'activité de la polymérase β responsable de l'excision/remplacement des paires de bases oxydées n'a pas permis d'établir de corrélation avec la longévité pour les fibroblastes dermiques de mammifères de longévité comprise entre 5 et 122 ans (Brown & Stuart 2007). De plus, l'activité du protéasome et des enzymes de réparation des protéines carbonylées n'est pas corrélée à la longévité chez les mammifères (Salway et al. 2011; Hulbert et al. 2007). Le support à la théorie provenant de ces études est donc difficile à interpréter.

Les études comparatives sur le taux de production des ERO par les mitochondries sont plus nombreuses. Ce type d'étude a commencé il y a 20 ans et suscite encore beaucoup d'intérêt. Les résultats ont donné un certain support à la théorie du vieillissement par le stress oxydant, mais les méthodes ont beaucoup changé et la validité des résultats des études précédentes est parfois à remettre en question. Les premières mesures ont été faites sur des particules sous-mitochondriales. Elles ont cédé le pas aux études utilisant les isolations de mitochondries fraîches et intactes pour plus de rigueur à représenter les conditions physiologiques et les interactions entre la matrice et le STE. Utilisant l'une ou l'autre de ces deux techniques, le groupe Sohal et Ku a montré au début des années '90 une relation inverse entre la production des ERO primaires (anion superoxyde et H_2O_2) et la longévité de l'espèce (relation ERO-longévité) chez les mammifères, la mouche domestique et la (Sohal et al. 1989; Sohal et al. 1990; Ku et al. 1993; Sohal et al. 1993; Ku & Sohal 1993; Sohal 1993). Ces études se sont toutefois fait reprocher de ne pas avoir contrôlé la variable

confondante de la masse corporelle (Speakman 2005). Pour palier à ce problème, Barja et al. (1994) ont comparé le rat et le pigeon, qui sont tous deux de masse comparable. Ils ont montré que les mitochondries isolées du pigeon (longévité 28 ans) produisent un taux de H_2O_2 d'un ordre de grandeur inférieur à celui du rat (longévité 3.5 ans). La relation ERO-longévité a par la suite été démontrée chez trois espèces d'oiseaux de longévités différentes, mais de tailles semblables (Herrero & Barja 1998), entre la chauve-souris *Myotis lucifugus* (longévité = 34 ans) et deux espèces de souris de taille semblables *Blarina brevicauda* et *Peromyscus leucopus* (longévités de 2 et 8 ans respectivement) (Brunet-Rossinni 2004b; Brunet-Rossinni 2004a) et finalement entre six espèces de serpents de la famille des colubridés de longévité variant entre 7 et 25 ans (Robert et al. 2007). Dans le cadre des recherches sur l'athérosclérose, la relation ERO-longévité a été trouvée chez deux espèces de souris (*P. leucopus*, longévité max. 8 ans et *M. musculus*, longévité max. 3.5 ans; Csiszar et al., 2007) en utilisant les cellules endothéliales aortiques. Par contre, ce même groupe de recherche n'a pas obtenu de différence significative dans la comparaison entre le rat-taupo nu *Heterocephalus glaber* (longévité max 28 ans) et la souris domestique *Mus musculus* (longévité max 3.5 ans) (Labinskyy et al. 2006).

Une critique majeure à l'endroit de ce courant d'étude concerne les biais induits non seulement par l'utilisation d'espèces de tailles différentes, mais aussi l'utilisation d'espèces de distances évolutives inégales entre elles susceptible d'engendrer un certain degré de pseudoréplication (Speakman 2005). À l'inverser, plusieurs études ne se limitent qu'à comparer les espèces deux à deux, ce qui revient à une espérance statistique d'une chance sur deux de trouver l'association dans la direction désirée (Garland & Adolph 1994). Pour surpasser ces limitations, Lambert et al. (2007) ont mesuré à nouveau la production de H_2O_2 par les mitochondries isolées de 14 espèces de mammifères en appliquant des corrections statistiques pour la taille corporelle et la phylogénie (contrastes phylogénétiquement indépendants). La relation ERO-longévité est restée significative après ces corrections, mais seulement pour les mesures de

production de H_2O_2 en condition de passage inversé des électrons (PIE, figure 0.8) et non en condition de passage vers l'avant des électrons (PAE, figure 0.8). L'absence de corrélation en conditions de mesures plus « physiologiques » de PAE soulève des questionnements quant à la validité de la relation dans son ensemble. Les trois études qui ont suivi cette réanalyse ont utilisé des animaux de tailles semblables et de faibles distances évolutives; les résultats sont par contre ambigus. Brown et al. (2009) ont comparé la production de H_2O_2 de mitochondries isolées du foie de la souris *Mus musculus*, de la chauve-souris *Eptesicus fuscus* et du moineau domestique *Passer domesticus* (longévités de 3,5; 13,5 et 19 ans respectivement). Lorsque normalisée par la consommation d'oxygène, la production d'ERO s'est bien révélée supérieure pour l'espèce de courte longévité lorsque la succinate + roténone étaient utilisées ensemble (production d'ERO par le complexe III). Par contre, la production de H_2O_2 en PAE ne s'est pas révélée plus importante pour la souris que pour le moineau. De façon similaire, l'analyse de la production de H_2O_2 par les mitochondries isolées du foie, du cœur et des muscles squelettiques du rat et du pigeon par Montgomery et al. (2011) n'a pas confirmé la relation ERO-longévité en PAE, mais seulement en PIE pour le cœur. Ce groupe de recherche a ensuite comparé trois espèces de perroquet (longévité de 21, 25, 35 ans) à deux espèces de cailles (longévité de 5 et 6 ans). Quelle que soit la méthode de normalisation (mg de protéines mitochondriales ou consommation d'oxygène) et quel que soit l'organe (cœur, foie, muscle squelettique), la relation inverse ERO-longévité n'a pas été confirmée. On peut toutefois reprocher à ces dernières études la faible différence de longévité entre les espèces comparées.

À ce point de la recherche, la démonstration de la relation inverse ERO-longévité est donc confinée à la condition non pertinente (d'un point de vue physiologique) de PIE. Cet ensemble d'étude n'apporte donc pas un grand support à la théorie du vieillissement par le stress oxydant mitochondrial étant donné le peu d'intérêt que représente la condition de PIE. Le domaine de recherche doit donc être considéré comme encore en plein développement. En effet, il est difficile de tirer une

conclusion définitive sur l'existence de la relation inverse ERO-longévité à la vue de la disparité de tissus utilisés (foie, cœur, rein, cerveau, muscle squelettique), fractions biologiques utilisées (fragments mitochondriaux vs mitochondries intactes), et du manque d'uniformité quant à la masse corporelle et la distance phylogénétique entre les espèces utilisées. Le plus grand obstacle à une réanalyse forte reste toutefois la diversité des états de métabolisme mitochondriaux utilisés à ce jour et dont la majorité ne sont pas représentatifs des conditions physiologiques. Ainsi, malgré le grand nombre d'études, la relation ERO-longévité reste encore à établir et la question suscite toujours beaucoup de débat.

La théorie du vieillissement par le stress oxydant mitochondrial a par ailleurs récemment trouvé un support beaucoup plus uniforme auprès des études comparatives sur la résistance intrinsèque des macromolécules à l'oxydation. Les protéines et l'ADN se sont révélées plus résistants chez les espèces de grande longévité (révisé par Pamplona & Barja 2011). Par exemple, la méthionine est proportionnellement moins présente dans les protéines des espèces de grande longévité. La résistance de leur protéine s'en trouve améliorée puisqu'il s'agit de l'acide aminé de plus grande susceptibilité à l'oxydation (Pamplona & Barja 2011; Ruiz et al. 2005). Aussi, l'analyse de 94 espèces animales (invertébrés, oiseaux et mammifères) montre que l'énergie libre de liaison du double brin d'ADN mitochondrial résultant de la composition en bases A, T, C et G serait moins élevée chez les espèces de plus grande longévité. Il en résulterait une plus grande résistance aux dommages endogènes chimiques tels que l'attaque par les ERO (Samuel, 2005; tiré de Pamplona & Barja, 2011).

L'analyse comparative des lipides membranaires apporte toutefois le meilleur exemple de relation positive entre la résistance à l'oxydation des biomolécules et la longévité des espèces. Cette possible adaptation serait à double action; les membranes cellulaires ne sont pas seulement des cibles pour l'attaque des ERO, elles agiraient à

leur tour comme générateur d'ERO secondaires tout aussi délétères. Les AGPI, et particulièrement les acides gras hautement insaturés (AGHI) sont très sensibles aux ERO qui provoquent la peroxydation lipidique. Lorsqu'ils sont estérifiés aux phospholipides des membranes cellulaires, l'agencement en parallèle des acides gras (AG) favorise la propagation rapide de l'oxydation d'un AGPI à un autre. Cette réaction en chaîne (autoxydation) peut impliquer plusieurs AGPI avant d'être stoppée par un antioxydant lipophile. De plus, une fois oxydés, les AGPI peuvent fractionner et produire des aldéhydes réactifs qui se comportent comme des ERO secondaires. La séquence qui suit montre les étapes de la peroxydation lipidique d'un AGPI (LH) menant à la production d'un aldéhyde réactif en prenant l'exemple d'une réaction initiée par un radical hydroxyle (OH^\bullet). L'initiation commence par l'abstraction d'un atome d'hydrogène *bis* allylique (un atome d'hydrogène lié à un carbone situé entre deux doubles liens), représenté par le H dans la notation LH (1).



La chaîne carbonée ainsi oxydée se nomme alkyle lipidique radicalaire (L^\bullet). L'atome de carbone possédant un électron non apparié sur cette chaîne est en effet un radical libre à ce stade. La deuxième étape, la propagation, demande la présence d'oxygène moléculaire O_2 . La réaction de l'alkyle lipidique radicalaire avec le dioxygène est très rapide et produit le peroxyde lipidique (LOO^\bullet) qui demeure un radical libre au sens strict (2).



Le peroxyde lipidique (LOO^\bullet) se comporte ensuite comme le ferait un ERO primaire tel que le radical hydroxyle i.e. il peut conduire à l'abstraction d'un hydrogène *bis* allylique sur un autre AGPI adjacent (3) opérant ainsi une propagation.



Cette réaction est toutefois beaucoup plus lente; la durée de vie moyenne des LOO^\bullet étant de 10 secondes (Borg 1993). La propagation peut produire plusieurs hydroperoxydes lipidiques (LOOH) pour un seul événement d'initiation, il s'agit de l'effet multiplicateur. À leur tour, les LOOH ainsi formés peuvent revenir à la forme LOO^\bullet en présence de métaux de transition (M) selon l'équation générale (4)



À partir de la forme LOO^\bullet , les chaînes carbonées oxydées peuvent suivre la voie de la formation d'endoperoxydes cycliques qui résulte dans la fragmentation de la chaîne et la libération d'aldéhydes réactifs. Les chaînes d'autoxydation peuvent être stoppées par un antioxydant moléculaire liposoluble tel que l'alpha-tocophérol (vitamine E). La figure 0.3 montre un exemple de peroxydation de l'acide arachidonique (20:4n6) qui mène à la formation du malondialdéhyde (MDA).

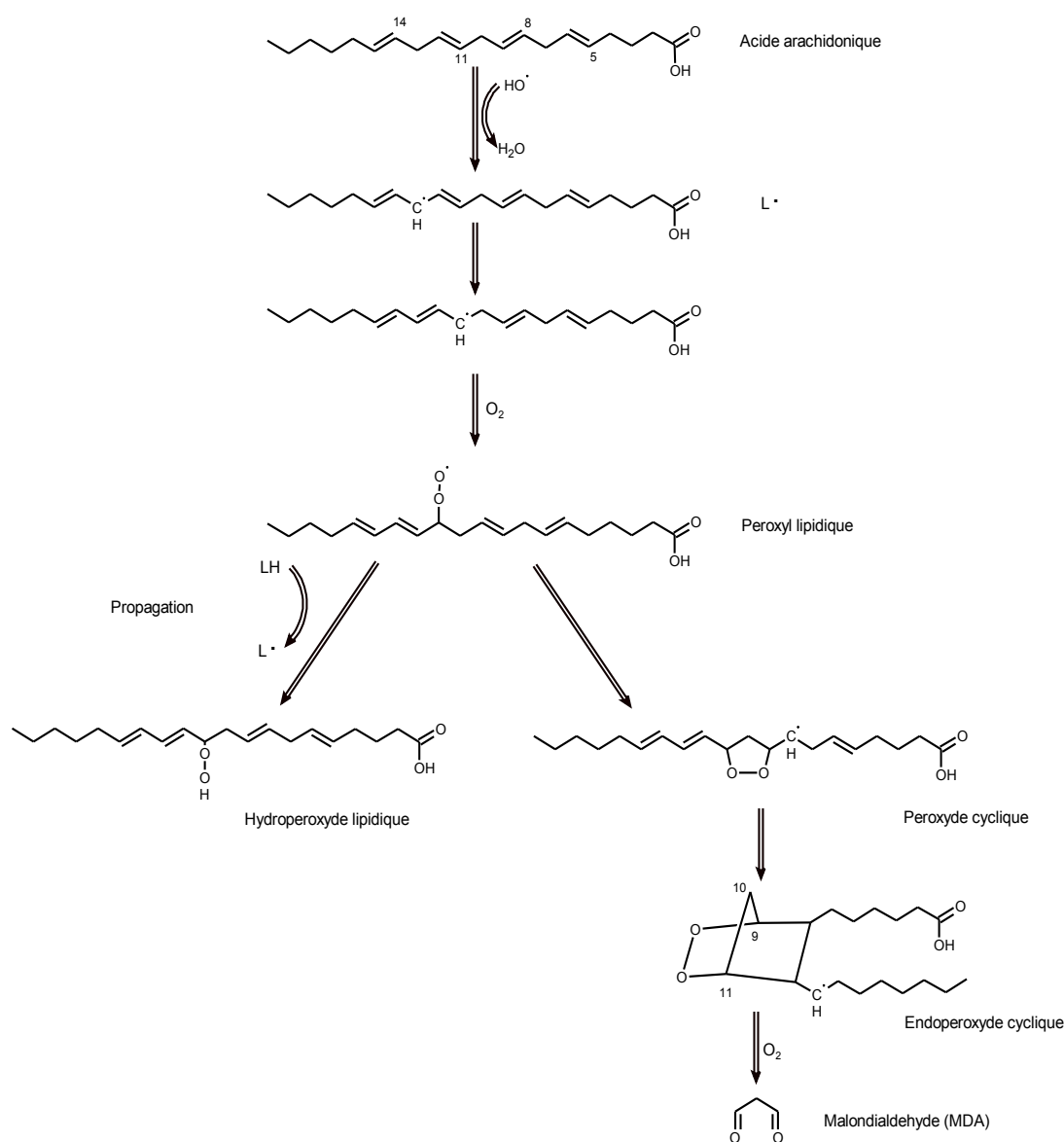


Figure 0.3 Peroxydation de l'acide arachidonique ($20:4\Delta^{8-14}$) par un radical hydroxyle. À partir de la forme LOO^\bullet , la réaction peut se propager sur un autre AGPI ou produire un aldéhyde réactif (MDA représenté ici). Adapté de Halliwell & Gutteridge (1999).

Les aldéhydes réactifs libérés par les acides gras oxydés ont également un pouvoir oxydant et dénaturant. La figure 0.4 illustre deux exemples d'aldéhydes réactifs issus de la peroxydation lipidique formant un adduit à un résidu lysine d'une protéine.

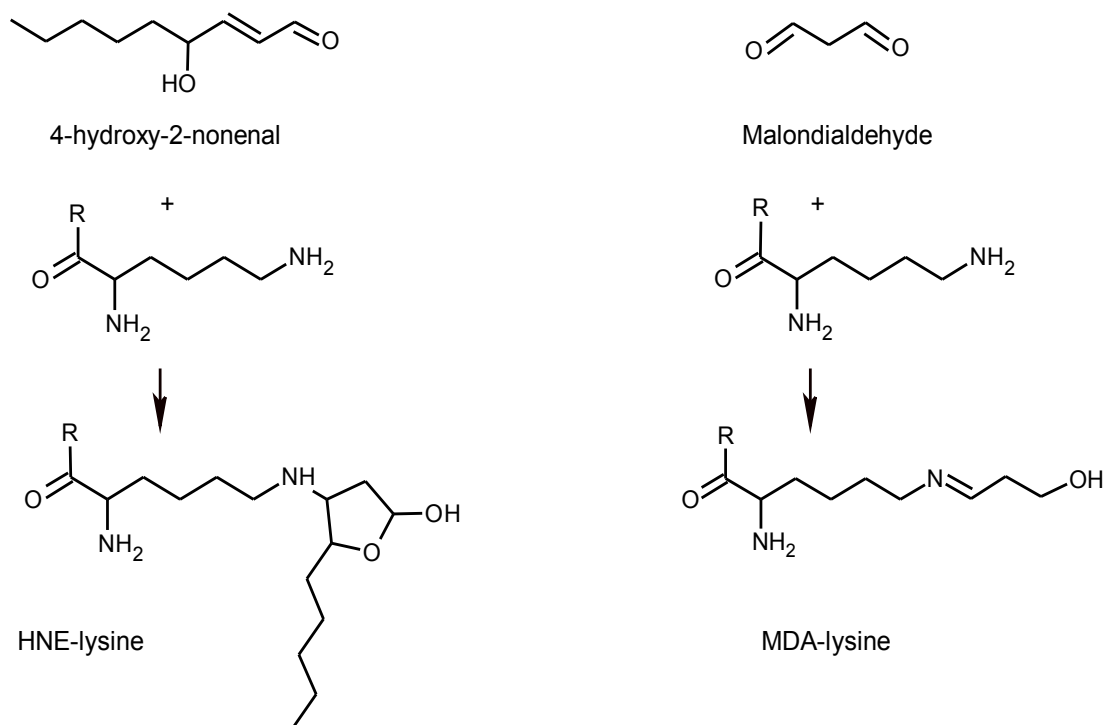


Figure 0.4 Aldéhydes réactifs issus de la peroxydation des AGPI formant un adduit à un résidu lysine d'une protéine. Des adduits similaires peuvent être formés sur l'ADN et les aminophospholipides conduisant à la dénaturation et dans le cas de l'ADN à l'insertion de mutations et délétions. Adapté de Halliwell & Gutteridge (1999).

Dans le cas de la formation d'adduits à l'ADN, la réparation imparfaite des bases est susceptible de laisser derrière elle des mutations et délétions de la même façon que ce qui est observé pour l'oxydation des bases d'ADN par les ERO primaires. Plusieurs auteurs réfèrent donc à ces aldéhydes réactifs en tant qu'ERO secondaires, terme qui inclut aussi les dérivés nitreux réactifs.

La susceptibilité à l'oxydation des AG a été déterminée empiriquement par la mesure de la consommation d'oxygène de solutions pures d'AG méthylés (Holman 1954). La valeur de consommation d'oxygène pour chaque groupe d'AG a été traduite en un indice de susceptibilité à l'oxydation (indice de peroxydation) normalisé à une valeur

de 1 pour un AG à deux doubles liens. En utilisant ces indices spécifiques, il est possible de calculer un indice de peroxydation (IP) général d'une membrane cellulaire suivant une analyse de la composition en AG des lipides polaires. Au milieu des années '90, deux études pionnières ont pavé la voie de la recherche d'une relation inverse entre la longévité et la valeur d'IP (relation IP-longévité). Choi et al. (1996) ont d'abord montré que l'IP était plus élevé dans les membranes des mitochondries du cerveau de la lignée de souris SAM P1 (sénescence accélérée) que dans la lignée SAM P2 (sénescence normale). La même année, Pamplona et al. (1996) ont montré que l'IP était plus faible dans les mitochondries du foie du pigeon (longévité de 35 ans) que dans celles du rat (longévité de 4 ans), la comparaison a ensuite été validée pour les mitochondries du cœur (Pamplona, Portero-Otin, Requena, et al. 1999). Ce groupe de recherche a aussi mis en évidence la relation en comparant l'IP des mitochondries de foie de huit espèces de mammifères de longévités comprises entre 3,5 et 46 ans (Pamplona et al. 1998). La relation a par la suite été validée dans les phospholipides totaux du cœur de ces mêmes espèces (Pamplona, Portero-Otin, Ruiz, et al. 1999). Par la suite, l'association IP-longévité a été montrée en comparant des oiseaux et des mammifères de tailles similaires; les phospholipides totaux du cœur de canari et de perruche (longévité de 21 et 24 ans) ont été comparés à ceux de la souris *Mus musculus* (longévité = 3,5 ans) (Pamplona, Portero-Otin, Riba, et al. 1999). Ce même groupe de recherche a ensuite montré la relation dans les lipides totaux du foie de sept espèces de mammifères (Pamplona et al. 2000). Ces chercheurs ont par la suite précisé que la relation pouvait se retrouver même en considérant la composition en AG séparément pour les phospholipides PC, PE et pour la cardiolipine des mitochondries de foie (Portero-Otin et al. 2001). Les études comparatives chez les mammifères et les oiseaux ont ensuite été reprises par le groupe Hulbert/Else/Buttemer. Ils ont utilisé l'intéressant modèle du rat-taupo nu *Heterocephalus glaber* (longévité = 28 ans) et de la souris *Mus musculus* (longévité = 3,5 ans) pour éviter le problème de la comparaison d'espèces de tailles différentes qui afflige tout autant ce domaine de recherche que celui de la relation inverse entre ERO

et longévité. Le modèle préserve non-seulement la similarité de taille mais aussi d'origine évolutive entre les espèces tout en présentant une différence importante de longévité maximale. Les auteurs ont montré l'association IP-longévité pour les PL totaux du muscle squelettique, du cœur, du rein, du foie et pour les PL des mitochondries de foie (Hulbert, Faulks, et al. 2006). De la même façon, le groupe a montré que la longévité exceptionnelle des échidnés est associée à un plus faible IP des phospholipides du foie, des mitochondries de foie et du muscle squelettique, lorsque comparés à ceux des mammifères de taille semblable (Hulbert et al. 2008). L'association IP-longévité a par la suite été montrée pour les phospholipides totaux du cœur entre la volaille et les oiseaux marins (Buttemer et al. 2008). Plus récemment, l'association IP-longévité dans la comparaison rat-pigeon a été revisitée pour inclure un plus grand nombre de tissus et isolats mitochondriaux. L'association reste valide pour six tissus et trois types de mitochondries (tissus différents) à l'exception du cerveau (Montgomery et al. 2011).

Chez les invertébrés, deux études ont associé l'IP à la longévité par comparaison intraspécifique plutôt qu'interspécifique. Ainsi, les reines de l'abeille à miel (longévité = 8 ans) ont un IP inférieur aux ouvrières qui vivent moins longtemps (longévité = 38 jours) (Haddad et al. 2007). Chez le nématode (*Caenorhabditis elegans*), la composition en AG totaux de six lignées mutantes et sauvages couvrant un gradient de longévité d'un ordre de grandeur présente une corrélation inverse hautement significative avec la longévité (Reis et al. 2011). Les évidences de l'implication de l'IP dans la modulation de la longévité dépassent le cadre des démonstrations comparative. La restriction calorique, protéique ou en méthionine est reconnue pour prolonger la longévité maximale chez les rats et les souris (Naudí et al. 2011). Ces études montrent également une diminution de l'IP dans le foie et le cœur associée à une diminution des marqueurs de la peroxydation lipidique. Ces effets sont légers pour un traitement de quelques semaines ou quelques mois (2,5 à 10% de diminution de l'IP), mais augmentent en magnitude lorsque le traitement est maintenu

pour la vie entière de l'organisme. De plus, la manipulation directe de la teneur en AGPI des membranes a également été tentée par l'approche de sélection/omission diététique des AGPI (également révisé dans Naudí et al., 2011). Malgré le fait que chez les vertébrés l'IP soit sous contrôle homéostatique partiel visant à compenser les écarts diététiques, ces traitements diététiques aigus ont permis d'abaisser l'IP dans les mitochondries de cœur, du foie et du cerveau du rat (Herrero et al. 2001; Portero-Otin et al. 2003; Pamplona et al. 2004). Ces changements ont été accompagnés d'une diminution des marqueurs de la peroxydation lipidique tels que les adduits de MDA et de CML aux protéines, ainsi que les marqueurs de peroxydation sur l'ADN mitochondrial (ADNmt), mais pas sur l'ADN nucléaire (ADNn) (voir la section « l'ADN mitochondrial comme cible des ERO »). Les rares études génétiques supportent également une implication des lipides membranaires dans la modulation de la longévité. Le knockdown du gène *fat-4* codant pour la désaturase Δ -5 (responsable de l'élévation du niveau d'insaturation des AG oméga-6 et-3) réduit l'IP et prolonge la durée de vie chez *Caenorhabditis elegans* (Reis et al. 2011; Hulbert 2011).

L'étude des lipides membranaires offre donc un support majeur à la théorie du vieillissement par le stress oxydant mitochondrial. Les études ne se limitent pas à une approche comparative mais suggèrent une relation de cause à effet entre l'IP et la longévité. Par conséquent possible de l'importance de la démonstration, les auteurs ont ignoré qu'il s'agisse d'un cas particulier du contexte général de la théorie du vieillissement par le stress oxydant et ont nommé leur hypothèse « Homeoviscous-longevity theory of aging » dans le cas du groupe Barja/Pamplona. Dans le cas du groupe Hulbert/Else/Buttemer la relation est nommée « Membrane pacemaker theory of aging » (Hulbert 2008). Les termes « pacemaker » et « homeoviscous » réfèrent respectivement à l'influence de l'IP sur la vitesse de fonctionnement des enzymes transmembranaires et l'ajustement de la fluidité de la membrane. Dans la présente thèse, nous référons à l'implication des lipides comme modulateur de la longévité en

tant que relation inverse IP-longévité. Ce terme respecte qu'il s'agisse non pas d'une théorie du vieillissement intégrale, mais plutôt d'un raffinement de la compréhension de la théorie générale du vieillissement par le stress oxydatif.

Bien que la relation IP-longévité bénéficie de beaucoup de support, elle n'est pas complète pour pourtant. Dans une réanalyse des phospholipides du muscle squelettique de 42 espèces de mammifères, Valencak & Ruf (2007) ont corrigé pour la masse corporelle et la phylogénie. Alors qu'ils trouvent une relation inverse significative avec la longévité pour la teneur en acides gras omega-3 et pour le ratio n-3/n-6, la relation pour l'IP n'est pas significative. De plus, l'approche comparative n'a pas réussi à mettre en évidence la relation pour les lipides membranaires du cerveau chez les mammifères (Hulbert, Pamplona et al. 2007). Ces manquements laissent donc encore un doute quant à la nature universelle de cette relation.

Le bilan de l'ensemble des études comparatives (et expérimentales) sur les quatre niveaux de modulation du stress oxydant est ambigu. En l'absence des évidences apportées par l'étude des lipides membranaires, il ne resterait que peu de support d'une implication des mécanismes oxydatifs dans l'établissement de la vitesse de sénescence. La démarche a aura toutefois permis de grandement raffiner les hypothèses et les objectifs de recherche. Par exemple, les macromolécules et autres biomolécules ne sont plus vues comme étant des cibles égales en terme d'impact sur le fonctionnement cellulaire suivant leur oxydation. En particulier, l'oxydation de l'ADNmt est maintenant considéré comme facteur de première importance, et cette nuance se doit d'être intégrée dans les objectifs de recherche.

L'ADN mitochondrial comme cible des ERO

Les recherches passées ont apporté un appui très inégal à la théorie du vieillissement par le stress oxydant selon le niveau de modulation du stress oxydant considéré. Le

raffinement proposé par la théorie du vieillissement par le stress oxydant *mitochondrial* permet de réconcilier ces contradictions. Cette approche plus récente met l'accent sur le rôle de la mitochondrie non seulement comme source des ERO, mais également comme cible primaire en importance. Plus particulièrement, l'ADNmt serait la macromolécule dont l'altération serait la plus directement liée à la progression de la sénescence.

L'haplotype mitochondrial (ADNmt) se présente sous la forme d'un brin circulaire ou linéaire (selon l'espèce) d'environ 15 000 paires de bases sans introns. De deux à dix copies de l'haplotype sont regroupées en nucléoïdes (amas de matériel génétique) par des protéines stabilisatrices. Ces nucléoïdes, ne sont pas protégés dans un noyau comme l'est l'ADNn et les imageries récentes montrent qu'ils entrent en contact direct avec la membrane interne. Ils sont donc présent au site même où sont produits les ERO primaires ainsi que les ERO secondaires qui découlent des processus de lipoxidation dans la membrane interne. De plus, le brin d'ADNmt n'est pas protégé par enroulement autour d'un squelette d'histones comme l'est l'ADNn, de ce fait, il est entièrement exposé aux agents chimiques du milieu. Puisqu'il est principalement codant, chaque mutation se répercute par une perte de fonctionnalité d'un gène mitochondrial. L'ADNmt devrait donc présenter un taux d'accumulation de dommages oxydants beaucoup plus important que dans le cas de l'ADNn. Barja et al. (1994) et plus récemment, Pamplona (2011) font une revue approfondie des évidences à cet effet. Il a été démontré que l'ADNmt contient une concentration plusieurs fois plus élevée de 8-oxodG que l'ADNn (Barja 2004; Herrero & Barja 2001). Ceci n'est pas dû à une différence de capacité de réparation du 8-oxodG en milieu mitochondrial par rapport au milieu nucléaire (Anson et al, 1998; tiré de Pamplona, 2011). Sans surprise, il a également été démontré que le taux de mutation de l'ADNmt est également beaucoup plus élevé que celui de l'ADNn (Bohr 2002).

La théorie du vieillissement par le stress oxydant *mitochondrial* propose donc un raffinement par rapport à la vision précédente. Elle propose que la composante centrale de la sénescence résulte de l'accumulation de mutations à l'ADNmt et non à des dommages à l'ADNn ou aux macromolécules renouvelables telles que les protéines. Puisque l'ADNmt code pour les sous-unités qui sont au cœur du fonctionnement du système de transport des électrons (Lenaz & Genova 2010), leur dégradation se refléterait par une perte directe de la capacité de synthèse de l'ATP laquelle affecterait la vitalité des tissus et organes et leur capacité de faire face à un stress (Khrapko & Vijg 2009). L'ATP est non seulement indispensable aux cellules afin qu'elles assument leur fonctions spécifiques, elle l'est aussi pour qu'elles opèrent les processus de réparation et de renouvellement des composantes cellulaires. La perte de la capacité de synthèse de l'ATP serait donc théoriquement tout à fait capable d'expliquer la majeure partie du phénomène de la sénescence et de son caractère endogène, progressif, délétère et irréversible.

En appui à cette vision, la diminution des capacités de phosphorylation oxydative des mitochondries en fonction de l'âge dans les tissus post mitotiques a été confirmée à quelques reprises (Fannin et al. 1999; Kwong & Sohal 2000; Tonkonogi et al. 2003). De plus, la perte de la capacité de réparation de l'ADNmt par knockdown de la polymérase gamma chez la souris provoque un vieillissement accéléré très fidèle d'un point de vue phénotypique et biochimique à celui observé naturellement (Trifunovic et al. 2004; Kujoth et al. 2005). Les traitements de restriction calorique (ou protéiques), connus pour augmenter la longévité, abaissent plus efficacement la proportion de 8-oxodG dans l'ADNmt que dans l'ADNn (Pamplona 2011).

Un rôle principal de l'ADNmt comme cible des ERO permet de réconcilier l'absence de corrélation positive entre la longévité et les défenses antioxydantes. Le contact direct entre l'ADNmt et le site de production des ERO (membrane interne) ne permet aucun temps de diffusion source-cible, lequel est nécessaire au

fonctionnement efficace des enzymes antioxydantes matricielles hydrosolubles. À l'inverse, pour atteindre l'ADNn, les ERO doivent migrer de la mitochondrie au noyau cellulaire. Barja (2013) élabore sur ces aspects topologiques et suggère que pour prolonger la durée de vie d'une espèce il soit plus efficace, d'un point de vue évolutif, de diminuer la production des ERO (primaires et secondaires) que d'augmenter la quantité des enzymes et molécules antioxydantes matricielles. La diffusion des ERO d'une source à une cible, comme toute diffusion de molécule, ne suit pas une direction linéaire radiante depuis la source. Elle suit plutôt un mouvement Brownien ou aléatoire. De ce fait, une augmentation de la distance source-cible n'augmente pas le temps de diffusion source-cible, et donc la probabilité d'interception, de façon linéaire mais exponentielle. Il en découle que lorsque la distance source-cible diminue, les concentrations d'antioxydants hydrosolubles devraient augmenter exponentiellement pour maintenir une probabilité égale de capture des ERO. En d'autres mots, la pertinence biologique des défenses antioxydantes repose sur l'existence d'une certaine distance source cible.

L'argumentation de Barja (2013) propose que les défenses antioxydantes matricielles hydrosolubles ne sont pas le facteur ajusté en fonction de la longévité. Pour protéger leur ADNmt, les espèces de plus grande longévité diminueraient plutôt la production d'ERO par le STE, un changement dont les conséquences sont directes et linéaires même dans le cas d'une distance source cible nulle. Selon cette vision, les défenses antioxydantes cytosoliques pourraient décroître avec un accroissement de la longévité des espèces. En effet, une diminution de la production d'ERO par les mitochondries avec l'augmentation de la longévité permettrait un réajustement à la baisse à un niveau suffisant pour maintenir une protection adéquate du noyau et des autres composantes cellulaires. Les antioxydants cytosoliques seraient donc impliqués dans la prévention des maladies davantage liées à l'altération de l'ADNn qu'à l'ADNmt telles que le cancer. En appui à cette vision, les traitements diététiques et pharmacologiques visant à augmenter les défenses antioxydantes ont permis

d'augmenter la durée de vie moyenne des individus au sein du groupe traité en éliminant les mortalités précoces. Ces traitements sont par contre restés sans effets sur la durée de vie maximale (Hulbert et al. 2007). Ce cadre théorique permet de réconcilier les évidences très fortes d'une décroissance des capacités antioxydantes cytosoliques avec l'augmentation de la durée de vie. Par contre, pour être valide cet ensemble d'explication demande à ce qu'il y ait bien une relation négative entre production d'ERO mitochondriale et longévité. Il devient donc encore plus important, maintenant, de tester cette relation avec l'approche comparative. Mais comme toute aventure scientifique, cela doit se faire en tenant compte des erreurs passées pour affiner les méthodes et augmenter la force des évidences.

Les problématiques liées à l'approche comparative en physiologie du vieillissement

Le flux d'ERO total produit par la membrane interne des mitochondries dépend à la fois de la production d'ERO primaires par le STE et de sa multiplication en aldéhydes réactifs (ERO secondaires) par les lipides membranaires. Les études comparatives sur la relations inverses ERO-longévité et sur la relation inverse IP-longévité souffrent toutes deux des mêmes problématiques principales: les corrélations allométriques (masse vs. longévité) et l'inégalité des distance évolutive entre espèces comparées.

Les traits physiologiques sont souvent corrélés à la taille corporelle. Comme la taille corporelle est souvent associée à la longévité chez les mammifères et les oiseaux, les relations ERO ou IP-longévité pourraient être obtenues de façon biaisée, i.e. trouver un effet alors qu'il n'y en a pas (erreur de type I). En effet, lorsque réanalysées par Lambert et al. (2007) les espèces utilisées pour mesurer la production d'ERO par le groupe Ku et Sohal (Sohal et al. 1989; Sohal et al. 1990; Ku et al. 1993; Sohal et al. 1993; Ku & Sohal 1993; Sohal 1993) présentent effectivement une relation positive entre la taille corporelle et la longévité. Lorsque la correction statistique est appliquée, la relation ERO-longévité devient non-significative (Lambert et al. 2007). De la même façon, il est connu que la teneur en acides gras hautement insaturés

(AGHI) et particulièrement la teneur en ADH sont négativement corrélés à la taille corporelle chez les mammifères (Couture & Hulbert 1995; Hulbert, Rana, et al. 2002). La même relation a été trouvée chez les oiseaux (Hulbert, Faulks, et al. 2002).

Les corrections statistiques devraient pouvoir apporter une solution à l'utilisation d'espèces de taille corporelle différentes comme modèle de longévité. Ces corrections induisent par contre le biais inverse, soit de ne pas trouver la relation alors qu'elle existe (erreur de type II). En effet, la variable suspectée d'influencer la longévité peut très bien être liée à la fois à la longévité et à la taille corporelle par des relations de cause à effet indépendantes l'une de l'autre. Dans ce cas, la correction pour la taille corporelle annule l'effet de l'âge bien que la relation de cause à effet puisse exister réellement. Cette possibilité est souvent ignorée parce que la probabilité de l'occurrence d'une relation de cause à effet entre des traits physiologiques et une variable commune est faible. Il y a par contre des indications à cet effet dans le cas de la relation IP-longévité. La teneur en AGPI membranaire influence grandement la rapidité des processus métaboliques cellulaires liés à la membrane (Else & Hulbert 2003). L'économie de masse, en termes de besoins métaboliques, obtenue par l'augmentation de la taille corporelle chez les animaux semble aller de pair avec une diminution du contenu en AGPI membranaire (Hulbert, Rana, et al. 2002). Par conséquent, un certain niveau d'abaissement en AGPI observé entre une espèce de petite taille et de courte durée de vie et une espèce de grande taille et de plus grande longévité pourrait très bien servir les deux besoins d'ajuster le métabolisme à la taille et de diminuer la peroxydation lipidique. Dans ce cas, l'utilisation de modèle de masses corporelles différentes couplée à une correction statistique pour la masse représente une approche de très faible puissance de détection. La capacité de détecter la relation de cause à effet entre IP et longévité est perdue lorsqu'on enlève l'effet de la taille sur la teneur en AGPI. Pour cette raison, Buffenstein et al (2008) privilégient l'utilisation de modèles qui ne nécessitent pas de corrections i.e. les espèces de même taille corporelle mais de longévité différente.

Les espèces existantes sont le produit de l'évolution et partagent des ancêtres communs. Pour cette raison, les moyennes d'un trait physiologique pour chaque espèce ne représentent pas des données indépendantes telles qu'exigées par l'analyse de variance. La figure 0.5 représente une portion de l'arbre évolutif des mammifères.

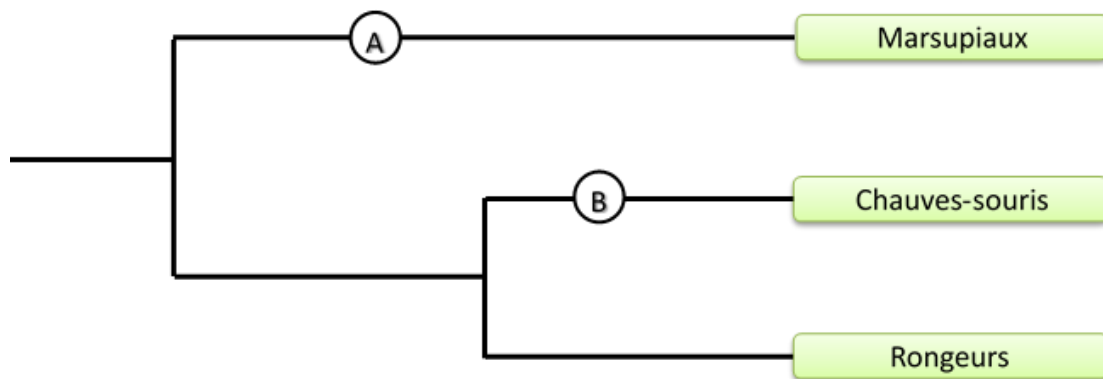


Figure 0.5 Section de la phylogénie des mammifères. Les points A et B représentent des événements d'évolution (mutation) fictifs dont les conséquences sont partagées par tous les descendants. Adapté de Speakman (2005).

Les espèces existantes sont le produit de l'évolution et partagent des ancêtres communs. Pour cette raison, les moyennes d'un trait physiologique pour chaque espèce ne représentent pas des données indépendantes telles qu'exigées par l'analyse de variance. La figure 0.5 représente une portion de l'arbre évolutif des mammifères.

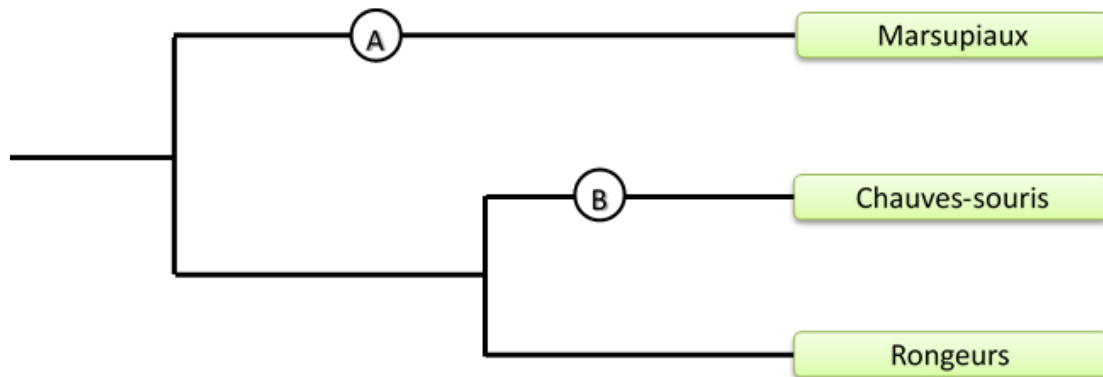


Figure 0.5 Section de la phylogénie des mammifères. Les points A et B représentent des événements d'évolution (mutation) fictifs dont les conséquences sont partagées par tous les descendants. Adapté de Speakman (2005).

Les points (A et B) représentent des événements évolutifs (mutation) fictifs qui confèrent une valeur particulière d'un trait, par exemple le niveau d'expression d'une protéine x. Dans le cas de l'événement A, les marsupiaux partageront des valeurs semblables pour l'expression de la protéine x. Dans le cas de l'événement B, les chauves-souris partageront des valeurs semblables pour l'expression de la protéine x. Si l'on tente une corrélation statistique entre la longévité et le niveau d'expression de la protéine x, les moyennes de chaque espèce pour ce trait ne pourront pas être considérées comme des répliquas indépendants puisqu'il s'agirait en quelque sorte de pseudo-réplication de l'événement de mutation à l'intérieur d'une lignée évolutive. Pour comprendre ce raisonnement, il faut garder en tête que la question est posée au niveau évolutif. Les statistiques devront donc être faites sur des répliquas indépendants en regard des événements évolutifs.

Des approches statistiques ont été développées qui permettent de tenir compte des distances évolutives entre les espèces de façon quantifiée (Garland et al. 1999). Lorsqu'une phylogénie basée sur des marqueurs moléculaires reconnus est disponible, les longueurs de branches sont utilisées pour estimer la distance évolutive. La méthode procède par le calcul de contrastes pondérés entre les espèces. Ainsi, les différences de longévité et les différences entre l'expression de la protéine x seraient pondérées par les distances évolutives. Les résultats obtenus par cette approche s'appellent contrastes indépendants de la phylogénie. À mesure que la distance évolutive entre les espèces à l'étude s'égale, les espèces tendent à être considérées comme statistiquement indépendantes. À l'inverse, si les distances évolutives sont très hétérogènes, les espèces rapprochées seront de moins en moins considérées comme indépendantes l'une de l'autre. Bien que cette méthode permette d'éliminer le biais relié à la pseudo-réplication, comme toutes techniques statistiques elles reposent sur un certain nombre de prémisses. Or, le respect de ces prémisses est parfois difficile, voire impossible à prouver. Ces limitations sont discutées dans Garland et al. (2005). Aussi les résultats corrigés et non corrigés sont-ils habituellement tous

deux présentés afin de permettre d'en apprécier les différences ou similarités. Lorsque les distances évolutives entre les espèces considérées semblent à peu près équivalentes, il peut être préférable de ne simplement pas utiliser les contrastes indépendants puisqu'ils risquent alors d'ajouter autant de biais qu'ils n'en éliminent (Buttemer et al. 2010b). Ainsi, les meilleurs modèles comparatifs sont ceux pour lesquels les distances évolutives sont les plus homogènes. Une façon simple d'améliorer l'homogénéité des distances évolutives est de choisir des espèces évolutivement rapprochées. Ces modèles sont évidemment rares puisque les traits physiologiques portent habituellement une signature phylogénétique e.g. les traits physiologiques ont tendance à être similaires au sein d'une lignée évolutive. Par exemple, à masse corporelle égale, la longévité est habituellement plus grande chez les primates que chez les ongulés. Les bivalves marins sont une exception à cette règle, leur longévité est très variable à l'intérieur d'une même lignée évolutive.

Les bivalves comme modèle biogérontologique

Le groupe des bivalves est un modèle animal en émergence dans le domaine de la recherche sur le vieillissement. Trois revues de littérature ont été publiées au cours de l'année 2009 pour en expliquer les mérites (Philipp & Abele 2009; Abele et al. 2009; Bodnar 2009). Parmi les facteurs mentionnés, la possibilité d'âger les individus récoltés dans le milieu naturel permet d'étudier la progression en âge de plusieurs variables sans avoir besoin d'élever soi-même les individus. Les années de croissance sont habituellement comptées par le nombre de bandes de déposition foncées dans la coquille pendant le ralentissement de croissance associé à l'hiver dans les régions tempérées, boréales et sub-arctiques (voir figure 0.6).

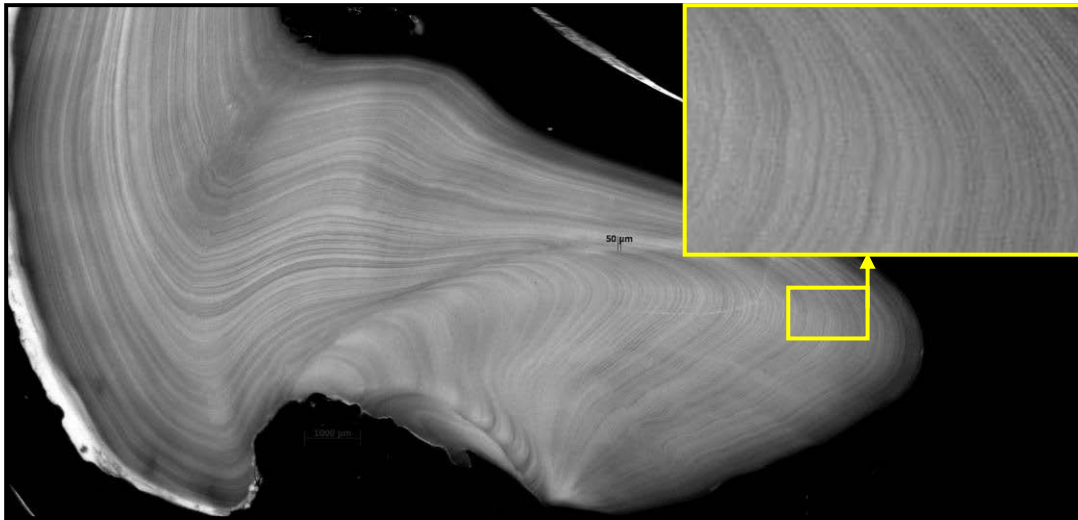


Figure 0.6 Coupe transversale d'une coquille de Quahog nordique (*A. islandica*) de 104 ans. L'encadré agrandi une zone où les lignes annuelles sont plus faciles à interpréter.

Également intéressant, les longévités peuvent être spectaculaires chez certaines espèces. Ainsi, Mulette perlière (*Margaritifera margaritifera*), une moule d'eau douce, peut atteindre l'âge de 190 ans (Ziuganov et al. 2000), la Palourde royale (*Panopea abrupta*) peut atteindre l'âge de 163 ans (Strom 2004), mais le record, non seulement parmi les bivalves mais parmi l'ensemble des métazoaires, revient au Quahog nordique (*Arctica islandica*) avec une longévité de 507 ans (Butler et al. 2013). Les mollusques bivalves sont particulièrement intéressants pour l'approche comparative des relations inverses ERO-longévité et IP-longévité. En effet, la signature phylogénétique sur le trait de la longévité semble faible au sein du groupe puisque nous retrouvons également des espèces de très faible longévité. Cela est possiblement dû à la grande variabilité de disponibilité d'énergie et de taux de prédation retrouvée entre les différents habitats chez ces espèces. Par exemple, *Arctica islandica* peut coloniser des habitats à faible disponibilité de nourriture (300 m de profondeur), les longévités sont alors très grandes dans la population. À

l'inverse, *Mya arenaria* colonise le milieu intertidal très riche en phytoplancton, mais à forte pression de predation. En accord avec les théories évolutives (adaptatives) du vieillissement qui prédisent un compromis entre longévité et performances physiologiques, *Mya arenaria* est caractérisée par une croissance rapide, mais une faible longévité (Ridgway, Richardson & Austad 2011). Ces contrastes permettent de constituer des modèles comparatifs comportant de grandes divergences de longévité au sein d'un groupe évolutif rapproché. Dans les eaux atlantiques canadiennes il existe cinq espèces de tailles semblables, appartenant toutes au groupe taxonomique des hétérodontes, qui permettent de former un modèle comparatif très contrasté. Dans ce groupe, les longévités varient de 28 à 507 ans entre *Mya arenaria* et *Arctica islandica*, voir la figure 0.7.

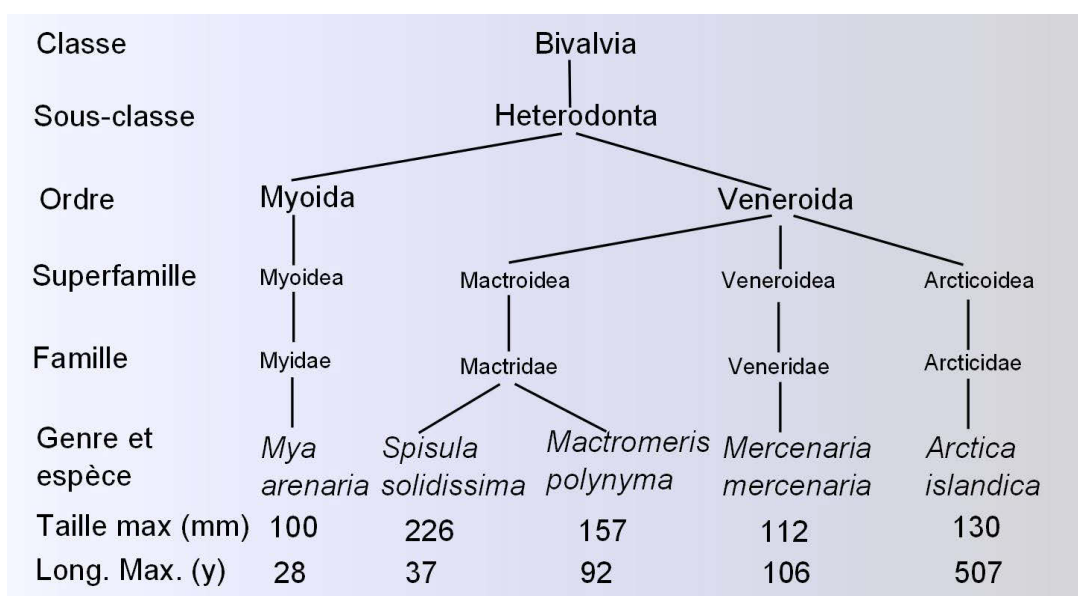


Figure 0.7 Taxonomie, taille et longévité des cinq espèces formant le modèle comparatif de bivalves marins de la sous-classe hétérodontes.

D'un point de vue biologique, un bon modèle comparatif est un ensemble d'espèces pour lesquelles la divergence du trait à l'étude (e.g. la longévité) est maximale alors que la divergence des autres traits d'histoire naturelle et de l'environnement génétique est minimale. D'un point de vue statistique, un bon modèle comparatif évite la pseudo réplication par un choix d'espèces de distances évolutives homogènes. Il évite aussi la covariation de la variable explicative (e.g. l'IP ou le taux de production d'ERO) et d'un autre trait (e.g. la taille corporelle) également susceptible d'expliquer la variable dépendante (e.g. la longévité). Un modèle satisfaisant à ces deux critères est très rare, mais puissant puisqu'il permet d'éviter le recours aux corrections phylogénétiques et à la correction pour la covariation allométrique. Les bivalves de la sous-classe hétérodontes présentés à la figure 0.7 représentent l'un des (sinon le) modèles comparatifs satisfaisant le mieux à ces critères. Alors que le modèle ne présente qu'un facteur 2,26 entre les deux tailles qui divergent le plus, il présente un facteur 18,1 entre les deux extrêmes de longévités. Ceci se compare avantageusement à l'ensemble des modèles présentés dans la littérature. Seule la comparaison entre la petite chauve-souris brune (*Myotis lucifugus*) et la musaraigne (*Blarina brevicauda*) se rapproche de ces divergences de longévité pour des organismes de taille semblables avec un facteur de longévité de 14 (Brunet-Rossinni 2004b). La taille corporelle est mesurée ici par la longueur des valves (plus grande dimension) et non par le poids. Ce choix est fait puisque la mesure de la masse corporelle est très sujette à fluctuation en fonction de la variation du contenu en eau chez les invertébrés marins. Néanmoins, les deux variables (longueur des valves et poids humide) sont bien corrélés chez ces espèces de bivalves (Roddick, Kilada, et al. 2007).

L'objectif général de cette thèse de doctorat est de tirer avantage de ce modèle unique pour tester à nouveau les relations ERO-longévité et IP-longévité. Les bivalves sont d'origine évolutive très ancienne. Leur biochimie, température, pression partielle d'oxygène et voies métaboliques sont différentes. Il est possible que les relations

inverse ERO-longévité et IP-longévité ne soient que des modulateurs de la longévité d'importances secondaires. Elles ne seraient alors observables que chez les groupes dont la physiologie est très stable et conservée d'une espèce à l'autre tels que les vertébrés endothermes utilisés jusqu'à maintenant. Dans ce cas, ces relations ne seraient pas observables chez les bivalves faute d'être perdues dans le bruit des divergences physiologiques et écologiques entre espèces. Si au contraire elles sont une composante fondamentale de la modulation de la longévité, alors elles devraient être présentes chez les organismes d'origine évolutive très reculées aussi, et non pas seulement chez des groupes récemment apparus.

Mesurer la production d'ERO par les mitochondries isolées.

Tester adéquatement la relation ERO-longévité ne demande pas seulement d'éviter certaines conditions de métabolisme mitochondrial non-physiologiques, mais également de tenir compte des particularités du STE du modèle biogérontologiques utilisé. La figure 0.8 présente un schéma de la membrane interne de la mitochondrie comprenant les composantes du STE retrouvées chez les modèles classiques tel que le rat et l'AOX, qui est propre aux bivalves.

Les complexes I à IV du système de transport des électrons ainsi que le complexe V forment ensemble le cœur du STE; ils sont respectivement responsables de la production d'un gradient de protons transmembranaire et de la formation d'ATP.

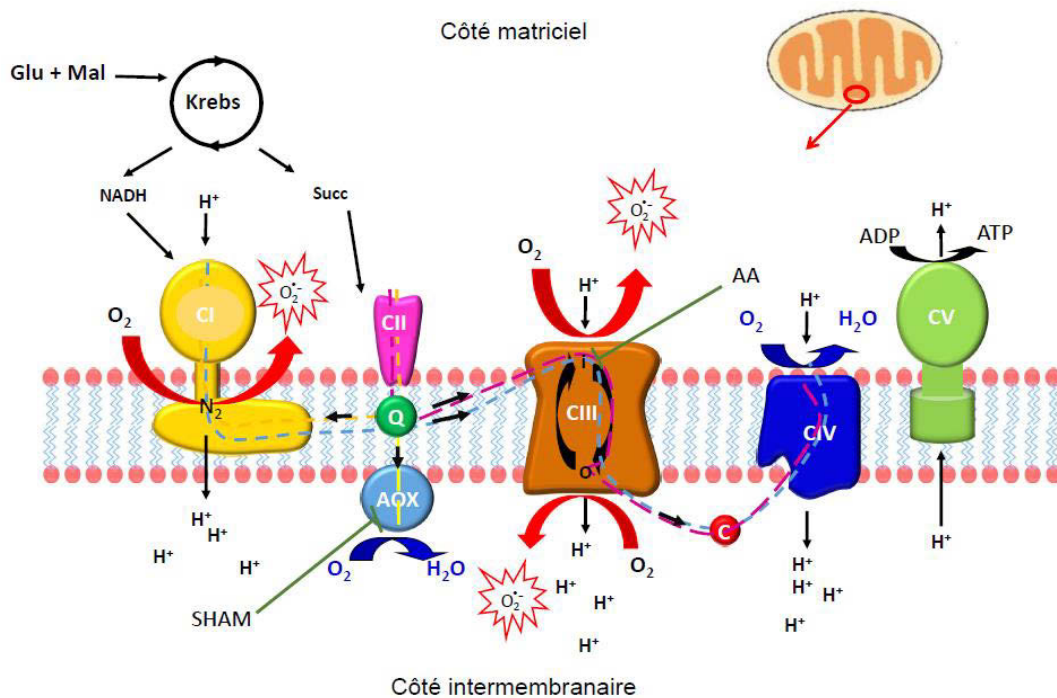


Figure 0.8 Système de transport des électrons de la membrane interne des mitochondries de bivalves. Les complexes I, III et IV sont les pompes à proton responsables de la formation d'une force proton-motrice utilisée par le complexe V pour la formation d'ATP. Les sens possibles de circulation des électrons sont représentés par les cheminements pointillés. Bleu, passage avant des électrons; orange, passage inversé des électrons; bleu et mauve ensemble, convergence des électrons; jaune, passage alternatif par l'AOX sans activité de pompage de protons. Les sites réducteurs de l'oxygène responsables de la production de l'anion superoxyde sont représentés au niveau des complexes I et III. Le site d'action des inhibiteurs est représenté par le symbole d'interférence vert. AA : Antimycine A; SHAM : acide salicylhydroxamique. See Lenaz & Genova (2010).

L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) est majoritairement produit au niveau des complexes I et III du système de transport des électrons (STE) comme réaction secondaire du processus de la phosphorylation oxydative. Il découle de la réduction électronique incomplète de l'oxygène i.e. les sites réducteurs de l'oxygène des complexes I et III ne donnent qu'un seul électron à la fois contrairement au site réducteur du complexe

IV qui les donne deux par deux pour réduire l'oxygène moléculaire en eau à la fin du cheminement des électrons. La nature du site réducteur de l'oxygène au niveau du complexe I a été l'objet d'un grand nombre d'investigations. En condition physiologique, il est maintenant suggéré que la réduction s'effectue au centre fer-soufre (FeS) N_2 situé dans le bras intra membranaire du complexe I (Kushnareva et al. 2002; Lenaz & Genova 2010; voir aussi figure 0.8). L'anion superoxyde est alors libéré du côté matriciel (St-Pierre, Buckingham et al. 2002; Muller, Liu et al. 2004). Au niveau du complexe III, deux sites (O et i) ont été mis en évidence qui impliqueraient chacun les anions semi-quinone comme réducteur direct de l'oxygène (revu dans Lenaz & Genova, 2010; voir aussi figure 0.8). Le centre O libère l'anion superoxyde du côté inter membranaire (St-Pierre, Buckingham et al. 2002; Miwa, St-Pierre et al. 2003), tandis que le centre i le libère du côté matriciel. La proportion de chacun ayant été revue récemment (Treberg et al. 2010). La production d'ERO par le complexe II a aussi été revue récemment, et il semblerait que ce complexe puisse aussi contribuer de façon non négligeable à la production totale d'anion superoxyde par le STE (Quinlan et al. 2012).

La production de l'anion superoxyde par des mitochondries isolées et intègres ne peut pas être mesurée directement puisqu'il s'agit d'un radical libre instable rapidement converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la superoxyde dismutase matricielle (MnSOD). Traditionnellement, la mesure se fait donc de façon indirecte par la quantification du H_2O_2 . Le principe repose sur le fait que les anions superoxydes libérés du côté matriciel sont rapidement convertis en H_2O_2 par la MnSOD naturellement présente alors que ceux libérés du côté intermembranaire le sont par la Cu/ZnSOD ajoutée en excès au milieu de dosage. Le H_2O_2 étant beaucoup plus stable et pouvant traverser la membrane interne de la mitochondrie, il est possible de le doser à l'aide d'une sonde fluorophore présente en excès dans le milieu de dosage. Le principe repose sur l'augmentation de la fluorescence suivant l'oxydation de la sonde par le H_2O_2 , une réaction catalysée par une peroxydase ajoutée. Dans les années '80 et

90', l'acide homovanillique était la sonde traditionnellement utilisée. Il est aujourd'hui remplacé par l'Amplex® red (ou l'Amplex ultra Red) qui présente l'avantage d'une plus grande sensibilité (Votyakova & Reynolds 2004; Mansouri et al. 2006), permettant la mesure des très faibles taux de production du H_2O_2 caractéristiques de la respiration mitochondriale sans inhibiteurs particulièrement chez les espèces à très faible taux métabolique telles que les invertébrés marins.

En condition d'homéostasie, la production de l'anion superoxyde par les mitochondries isolées a été évaluée entre 0,2 à 2 % de l'oxygène consommé (Staniek & Nohl 2000; St-Pierre et al. 2002), mais elle peut changer grandement en fonction de l'espèce et du tissu considérés. Particulièrement, la combinaison des substrats et inhibiteurs utilisée influence fortement la libération de l'anion superoxyde par les complexes du STE. La propension des sites réducteurs des complexes I et III à dévier les électrons vers l'oxygène moléculaire dépend en partie de leur niveau de réduction électronique. Celui-ci dépend du jeu entre le taux d'entrée des électrons dans le STE et la vitesse de circulation jusqu'au complexe IV. L'utilisation d'inhibiteurs bloque le passage des électrons et maximise le niveau de réduction des complexes en amont du site d'action spécifique. La condition de circulation en passage avant des électrons (PAE ; cheminement en bleu sur la figure 0.8) est obtenue par l'utilisation de substrats du complexe I tels que le pyruvate, le malate et le glutamate. Dans cette condition, il a été démontré que l'anion superoxyde est libéré par les trois sites principaux situés sur les complexes I et III, mais les taux de production sont faibles (Lenaz & Genova 2010). L'antimycine A (AA) est un inhibiteur du complexe III qui bloque les électrons en aval du site O de réduction de l'oxygène du complexe III. L'ajout d'AA augmente le niveau de réduction électronique des complexes I et III et augmente la production d'anion superoxyde. L'utilisation de succinate seul (sans substrats du complexe I) recrute également les trois sites principaux de production de l'anion superoxyde avec une production totale supérieure à celle obtenue en PAE. L'ajout d'AA en présence de succinate élève fortement le niveau de réduction

électronique du pool d'ubiquinone et force, de façon thermodynamique, le passage des électrons en sens inverse dans le complexe I jusqu'à la formation de NADH à partir de NAD⁺. Cette condition de passage inversé des électrons (PIE, cheminement orange sur la figure 0.8) maximise la production d'anion superoxyde au niveau du centre N₂ du complexe I et dans une moindre mesure au niveau du centre O du complexe III.

Il est bien établi maintenant que la production d'ERO en PIE est grandement dépendante de la force proton motrice. Dans toutes les études répertoriées, l'ajout d'ADP ou de découpleurs tels que le FCCP ou le DNP ont fait chuter la production de façon importante. La force proton motrice influence également la production d'ERO en PAE, mais dans une moindre mesure, ce qui est également le cas en condition de convergence des électrons (CE, cheminement bleu combiné au cheminement mauve sur la figure 0.8). Bien que la condition de PIE produise une plus grande quantité d'ERO, et que de ce fait elle ait été favorisée pour pallier au manque de sensibilité des premières sondes fluorophores, elle ne représente probablement pas une condition rencontrée *in vivo*. Il est même proposé que les électrons qui passent en sens inverse dans le complexe I n'utilisent pas la même séquence de sites intermédiaires que lorsqu'ils circulent en PAE (Hirst et al. 2008). De façon générale, la validité de l'utilisation des inhibiteurs pour la comparaison de la production d'ERO entre espèces a été remise en question; dans ces circonstances, la réduction des complexes atteint un niveau jamais obtenu en condition physiologique (Buffenstein et al. 2008). Les connaissances sur la production des ERO par le STE précédemment citées sont revues en détail dans Lenaz & Genova (2010).

Mécanismes modulateurs de la production des ERO : vertébrés vs bivalves

Les mécanismes proposés pour expliquer les différences de taux de production d'ERO entre les espèces sont limités. La diminution de la proportion entre les complexes générateurs de l'anion superoxyde par rapport au cytochrome C oxidase

(complexe IV) pourrait amoindrir le niveau de réduction électronique des sites de réduction de l'oxygène. Ainsi, Sohal (1993) avait proposé que les espèces animales de plus grande durée de vie aient une proportion plus élevée de complexes IV. Une diminution de la proportion du complexe I devrait conduire au même résultat en limitant l'entrée des électrons pour une capacité de circulation inchangée. Cette adaptation a souvent été rapportée pour expliquer la moindre production d'ERO par les espèces de plus grande longévité (St-Pierre et al. 2002; Pamplona et al. 2005; Lambert et al. 2010). Il est intéressant que la restriction calorique soit connue pour diminuer la proportion des complexes I puisque cette intervention diminue également la production d'ERO par les mitochondries isolées et prolonge la durée de vie (Naudi et al. 2007; Caro et al. 2008).

Les connaissances fondamentales sur la production d'ERO ont été acquises par l'observation des mitochondries isolées de mammifères. La présence d'oxydase alternative (AOX) chez certaines espèces d'invertébrés est susceptible d'affecter cette dynamique. Les AOX sont des composantes du système de transport des électrons, codées par l'ADNn, présentes chez les plantes, quelques algues, les protozoaires, plusieurs champignons, et plusieurs animaux invertébrés (Tschischka et al. 2000; Uribe & Khachatourians 2008; Lenaz & Genova 2010). Elles prennent leurs électrons à partir du pool d'ubiquinone et réduisent l'oxygène moléculaire en eau (cheminement jaune sur figure 0.8) sans activité de pompage de protons. Puisque les électrons sont acheminés à l'oxygène avant le complexe III et IV, le cheminement par l'AOX ne pompe de protons qu'au niveau du complexe I et aucun proton n'est pompé lorsque les électrons sont en provenance du complexe II. Chez plusieurs invertébrés marins, dont certains bivalves, il a été démontré que les AOX ont une affinité moindre pour l'oxygène par rapport à celle du complexe IV (Tschischka et al. 2000). La voie des AOX serait ainsi recrutée de façon proportionnelle à la PO_2 intracellulaire. La sensibilité des AOX à la disponibilité de l'oxygène moléculaire dissout serait un mécanisme de régulation passif permettant à plusieurs invertébrés

marins de se comporter en oxyconformateurs i.e. leur métabolisme augmente avec l'augmentation de la teneur en oxygène dissout du milieu. Il a été proposé que par ce mécanisme, les AOX protégeraient la cellule contre la production excessive des ERO qui accompagne l'hyperoxie lorsque l'eau est froide et saturée en oxygène (Abele et al. 2007). Les auteurs proposent également que les AOX puissent protéger contre la production excessive d'ERO en condition défavorable de ratio élevé d'ATP/ADP qui accompagne la dépression métabolique saisonnière ou comportementale. La présence des AOX est traditionnellement mise en évidence lorsque la consommation d'oxygène persiste en présence d'inhibiteurs du complexe IV tels que l'azoture de sodium (NaN_3) ou le cyanure de potassium (KCN). L'AOX est aussi spécifiquement inhibée par l'acide salicylhydroxamique (SHAM). L'utilisation du SHAM conduit par contre à une inhibition concomitante partielle (20%) du complexe IV, et inversement, le KCN inhibe aussi partiellement l'AOX (Tschischka et al. 2000). Étant donné les implications proposées de l'AOX dans le contrôle de la génération d'ERO, la régulation de cette enzyme pourrait être impliquée dans l'accroissement de la longévité chez les palourdes marines. Le recrutement de cette voie permettrait d'abaisser la production des ERO aux dépens d'une diminution du couplage entre la consommation d'oxygène et la production de l'ATP. Il est donc possible que des différences de taux de production de ROS entre espèces de bivalves de longévités différentes s'expliquent par une différente activité de l'AOX et non par les mécanismes observés chez les mammifères.

Traditionnellement, les mesures de production d'ERO sont normalisées par mg de protéines mitochondriales. Cette approche est actuellement remise en question puisque le protéome mitochondrial inclut des enzymes et protéines structurales impliquées dans les fonctions autres que la respiration aérobie et dont la proportion peut changer entre les espèces (Hulbert, Turner, et al. 2006). Chez les bivalves, la forte teneur en mucus (mucopolysaccharides) des homogénats de tissu conduit à la co-sédimentation des mitochondries avec d'autres protéines inconnues dans des

proportions variables entre espèces (observation personnelle). Il est donc nécessaire de normaliser la production d'ERO par un marqueur moléculaire spécifique à la mitochondrie. Dans une analyse de 12 marqueurs potentiels, (Larsen et al. 2012) ont montré que la cardiolipine et la citrate synthase sont les mieux corrélés au volume mitochondrial tel que mesuré par microscopie électronique. La citrate synthase étant de très loin plus facile à quantifier que la cardiolipine, elle s'impose maintenant de plus en plus comme facteur de normalisation pour la recherche en respirométrie. En effet, la citrate synthase se dose par la mesure de l'activité enzymatique selon un protocole simple au moyen d'un spectrophotomètre de base avec lequel plusieurs échantillons peuvent être analysés en même temps. Par contraste, la quantification de la cardiolipine demande habituellement une coûteuse étape préalable de séparation par chromatographie liquide pour chaque échantillon. La quantification se base ensuite sur des méthodes complexes telles que la dérivatization (Schlame et al. 1999), ou la détection par spectromètre de masse (Bird et al. 2011), selon les besoins de caractérisation des AG. Il est donc avantageux d'utiliser la citrate synthase pour les études sur la production d'ERO, en particulier chez les bivalves, puisque ce marqueur n'est pas beaucoup plus difficile à mesurer que les protéines mais offre une quantification spécifique presque aussi précise que la cardiolipine.

Mesurer l'indice de peroxydation membranaire

Mesurer l'IP chez les bivalves demande à bien comprendre l'approche développée chez les mammifère en un premier temps. Il faut ensuite adapter ce calcul afin d'intégrer la plus grande diversité de lipides rencontrés chez les bivalves.

Chez les plantes et les animaux supérieurs, les doubles liaisons des acides gras polyinsaturés sont habituellement intercalées par la présence d'un seul groupement méthyle en liaison simple. On réfère alors au type d'AGPI (par le terme anglais) en tant que « methylene interrupted polyunsaturated fatty acid ». La figure 0.9 montre un exemple de ce type d'acide gras dans le cas de la présence de deux double liaisons,

soit l'acide linoléique 18:2n6. Alors qu'un seul groupement méthyle est présent entre les doubles liaisons pour tous les acides gras des vertébrés, les acides gras NMI des bivalves marins ont quatre ou six groupements méthyles entre les deux doubles liaisons.

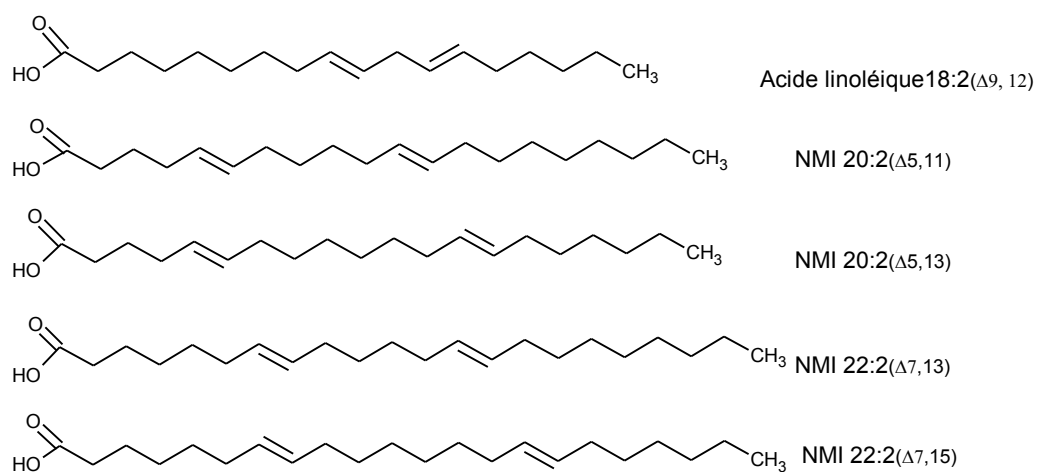


Figure 0.9 Structure d'un acide gras « methylene interrupted » typique des vertébrés et des quatre acides gras non-methylene interrupted (NMI) les plus communs chez les bivalves.

La résonnance des orbitales des doubles liaisons présentes de part et d'autre de ce groupement méthyle en fragilisent ses liaisons hydrogène (liaison *bisallylique*) qui deviennent alors susceptibles à l'attaque des ERO. Ainsi, chez les plantes et les animaux supérieurs, la susceptibilité à l'oxydation d'un acide gras dépend directement du nombre de doubles liaisons présent sur la chaîne carbonée. Pour les chaînes saturées et mono-insaturées, la susceptibilité à l'oxydation est très faible. À partir de deux doubles liaisons, la susceptibilité devient significative et augmente ensuite de façon non linéaire avec le nombre de doubles liaisons. La susceptibilité à l'oxydation des solutions pures d'acides gras méthylés a été mesurée empiriquement pour chaque classe de nombre de doubles liaisons (Holman 1954). Un indice représentant cette susceptibilité a été attribué pour chaque classe sur la base de ces mesures empiriques. Arbitrairement, la valeur de 1 a été donnée pour les acides gras à deux doubles liaisons. Suivant l'analyse de la composition en acides gras d'une membrane, il est possible de calculer un indice de peroxydation global (IP) pour celle-ci selon l'équation 0.1. Cette équation combine l'information sur la proportion de chaque classe d'acide gras dans la membrane et leur indice spécifique de susceptibilité à l'oxydation.

$$IP = (0 \times \% \text{ saturés}) + (0.025 \times \% \text{ monoènes}) + (1 \times \% \text{ diènes}) + (2 \times \% \text{ triènes}) + (4 \times \% \text{ tetraènes}) + (6 \times \% \text{ pentaènes}) + (8 \times \% \text{ hexènes}) \quad (0.1)$$

Chez les bivalves comme pour plusieurs autres groupes d'invertébrés marins, des désaturases supplémentaires permettent la voie de synthèse d'acides gras dont les doubles liaisons sont séparées par plus d'un groupement méthyle; ils sont alors appelés « non-methylene interrupted fatty acids » (NMI). Les plus courants chez les bivalves hétérodontes sont les 20:2 et 22:2 dont les doubles liaisons sont séparées par quatre ou six groupements méthyle (voir figure 0.9). L'éloignement des doubles liaisons sur ces acides gras atypiques affaiblit l'effet de résonnance des orbitales et par conséquent l'effet de fragilisation des liaisons hydrogène des groupements méthyle intercalés. La sensibilité à l'oxydation de ces acides gras a également été

mesurée empiriquement, permettant de leur attribuer une juste valeur d'indice de peroxydation (Kaneniwa et al. 1988). La formule (2) intègre ces valeurs et permet le calcul de l'indice de peroxydation pour des membranes de bivalves.

$$\text{IP} = (0 \times \% \text{ saturés}) + (0.025 \times \% \text{ monoènes}) + (0.258 \times \% \text{ 20:2 NMI}) + (0.32 \times \% \text{ 22:2 NMI}) + (1 \times \% \text{ diènes}) + (2 \times \% \text{ triènes}) + (4 \times \% \text{ tétraènes}) + (6 \times \% \text{ pentaènes}) + (8 \times \% \text{ hexènes}) \quad (0.2)$$

Les bivalves sont également riches en phospholipides de type plasmalogènes. Très répandus dans le règne animal, ces phospholipides sont en quantité trace chez les vertébrés sauf dans le cœur et le cerveau. Les proportions atteintes dans la majorité des organes des bivalves (20 à 55%) dépassent souvent celles retrouvées dans le cerveau des mammifères (20 %) (Farooqui & Horrocks 2001; Kraffe 2003). Ils diffèrent des phospholipides standards par le fait que la chaîne carbonée en position *sn*-1 (chaîne alkenyle) soit en liaison vinyle éther plutôt qu'en liaison ester (voir figure 0.10).

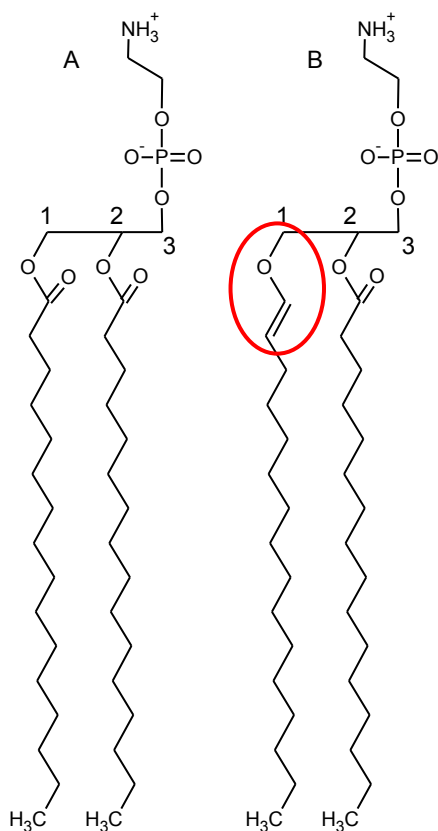


Figure 0.10 Forme standard et forme plasmalogène de la phosphatidyléthanolamine. A, 1acyl-2acyl-glycéro-3-phosphoéthanolamine. B, 1alkényle-2acyl-glycéro-3-phosphoéthanolamine. La liaison différente en *sn*-1 est identifiée dans la zone rouge.

Alors que chez les mammifères, les chaînes alkényle des plasmalogènes se limitent à entre 16 et 18 carbones saturés, il existe une beaucoup plus grande diversité chez les bivalves. Notamment, l'acide eicosamonoenoïque (20:1) est présent en grande abondance chez les hétérodontes. Si les chaînes alkényles saturées et mono-insaturées n'influencent pas grandement l'indice de peroxydation de façon directe étant donné l'absence de carbon *bisallylique*, leur importante abondance peut néanmoins diminuer la proportion relative des autres acides gras, notamment des AGHI, et par le fait même, l'IP d'une membrane. Elles doivent donc être incluses dans l'analyse

lipidique. Alors que les procédures standard de transestérification des acides gras des phospholipides produisent des méthylester d'acides gras MEAG, pour les chaînes alkényl des plasmalogènes, elles produisent des diméthylacétals (DMA, voir figure 0.11).

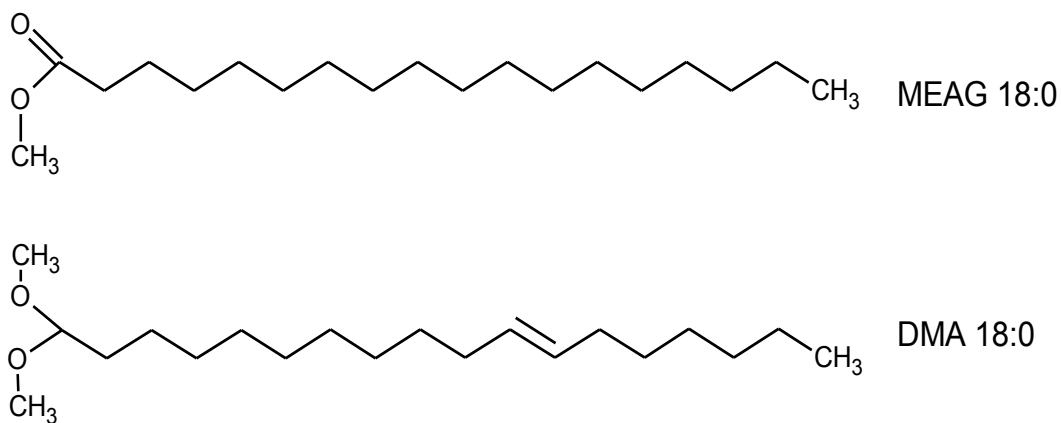


Figure 0.11 Structure d'un méthyle ester d'acide gras (MEAG) et d'un diméthyle acétal (DMA) de 18 carbones de longueur de chaîne.

Une propriété importante des plasmalogènes découle de la présence de la double liaison du lien vinyle éther qui est très susceptible à l'attaque des ERO. Puisque son oxydation ne conduit pas à la formation d'un peroxyde lipidique (LOO^\bullet), elle ne permet pas l'étape de propagation de l'oxydation des lipides membranaires comme le font les AGPI (voir figure 0.3). Les plasmalogènes agissent donc comme intercepteurs d'ERO ou de LOO^\bullet et donc comme stoppeurs de réaction en chaîne d'autoxydation. Pour cette raison, ils sont vus comme un puissant antioxydant membranaire constitutif (Engelmann 2004). Les capacités antioxydantes des plasmalogènes ont été démontrées pour le cerveau du rat lors de tests d'oxydation induite par la phosphine, un agent pro-oxydant (Kuczynski & Reo 2006). Il a également été démontré que la teneur en plasmalogènes du cerveau de rat s'ajuste à la hausse lorsque la teneur en ADH est augmentée par manipulation de la diète. Il a été suggéré qu'il s'agit d'un mécanisme de protection contre la susceptibilité élevée à l'oxydation de l'ADH au sein des membranes neuronales (Yavin et al. 2002). La capacité antioxydante des plasmalogènes ne peut pas être incorporée dans la simple équation du calcul de l'IP, elle doit donc être appréciée indépendamment afin d'estimer la susceptibilité à l'oxydation des membranes d'un organisme.

Remodelage lipidique membranaire induit par le froid

Comparer les IP chez des bivalves doit se faire en tenant compte des conditions pouvant affecter la composition lipidique au sein des membrane. Alors que la composition lipidique des membranes est stable chez les vertébrés endothermes, il est bien connu qu'elle soit influencée par la température chez les ectothermes en général et chez les bivalves en particulier.

La fluidité des membranes affecte grandement la vitesse des processus métaboliques qui y ont lieu tels que la perméabilité aux ions, le déplacement latéral des composantes intra membranaires et l'activité des enzymes intégrales. Lorsque la température diminue, les acides gras des phospholipides s'alignent entre eux et les

phospholipides se compactent. En deçà d'une certaine température (T_m), les lipides membranaires adoptent la phase gel cristalline caractérisée par une très faible fluidité. À l'inverse, au-delà d'un point de transition (T_H), la membrane perd la configuration planaire en double couche lipidique et chaque feuillet se replie pour adopter la forme hexagonale (voir Hazel & Williams, 1990). Seule la phase liquide cristalline est compatible avec le maintien de l'homéostasie cellulaire. Toutefois, même à l'intérieur des limites de cette phase, la fluidité membranaire peut varier grandement en fonction de la température ce qui représente une contrainte importante pour les organismes ectothermes tels que les bivalves marins.

Il a été observé que plusieurs espèces d'ectothermes ajustent leur composition lipidique en réponse au froid afin de maintenir une fluidité membranaire constante, une adaptation appelée « homeoviscous adaptation » (HVA). La HVA peut être opérée par un grand nombre de types de changements à la composition lipidique membranaire. Par exemple, elle peut être opérée par un changement de proportion des classes de phospholipides, de position des acides gras sur le squelette de glycérol et de longueur de chaîne. L'organisation spatiale des lipides membranaires peut aussi participer à la HVA dans une certaine mesure par la formation de rafts, un mécanisme dont la complexité dépasse le cadre de la présente contribution (Hazel & Williams 1990; Hochachka & Somero 2002; Moyes & Ballantyne 2011). Le plus étudié et possiblement le plus important de ces mécanismes d'ajustement reste toutefois l'augmentation du niveau d'insaturation des acides gras. La présence d'une double liaison au sein de la chaîne carbonée d'un acide gras induit un angle qui augmente l'aire latérale de la partie hydrophobe des phospholipides, désorganise l'alignement en parallèle, augmente la fluidité, augmente la porosité membranaire et augmente la propension à adopter la phase hexagonale (Hazel & Williams 1990). L'ajout d'une deuxième double liaison accentue ces effets avec une contribution qui représente environ la moitié de l'importance de la contribution apportée par la première double liaison. L'ajout de doubles liaisons supplémentaires ne contribue que d'une façon

négligeable à augmenter la fluidité membranaire et, dans le cas de la formation des AGHI comme l'ADH, peut même en réduire l'effet fluidifiant (Coolbear et al. 1983). L'essentiel de l'influence du niveau d'insaturation des AG sur la fluidité membranaire se résume donc assez bien par le calcul du ratio entre acides gras insaturés/saturés.

Les études récentes sur le micro environnement lipidique des enzymes transmembranaires suggèrent par ailleurs un rôle modulateur de l'activité direct des AGHI. Cette influence est donc en grande partie indépendante de l'état physique général de la membrane. Il est connu que les enzymes intégrales sont entourées d'une micro couche de phospholipides riches en AGPI dont la grande flexibilité favorise les mouvements de déformation qui accompagnent l'activité enzymatique. Cette association enzyme-lipide directe dicte la stabilité et la cinétique des enzymes transmembranaires. La relation est particulièrement bien décrite pour la rhodopsine (Grossfield et al. 2006) et les pompes sodium/potassium (Turner et al. 2003). Dans les deux cas, l'acide gras oméga-3, qui comporte le plus grand nombre de doubles liaisons (ADH, six), permet le plus grand assouplissement moléculaire et la plus grande activité enzymatique.

Encore une fois, la diversité des lipides membranaires chez les bivalves marins complique ces relations simples. Les NMI sont reconnus pour leur effet fluidifiant supérieur à celui des autres types d'acides gras insaturés (Zakhartsev et al. 1998). Ces acides gras peuvent être synthétisés *de novo*, permettant à l'organisme de moduler leur teneur membranaire indépendamment de la diète (Zhukova 1991). Ils est donc attendu qu'ils contribuent de façon majeure à la HVA (Barnathan 2009). Leur flexibilité n'étant pas comparable à celle des acides gras standards de même nombre de doubles liens (Rabinovich & Ripatti 1991), ils n'est pas proposé qu'ils agissent comme les AGHI dans le microenvironnement des enzymes transmembranaires. Les études sur l'adaptation au froid chez les bivalves présentent des évidences pour

supporter chacun des deux types de mécanismes de remodelage lipidique induit par le froid, soit la HVA et l'ajustement des interactions lipides-protéines (Pernet et al. 2006; Parent et al. 2008; Pernet et al. 2007; Pernet et al. 2008). Parce qu'elle influence la composition lipidique, la température représente donc un facteur confondant possible dans les comparaisons d'IP entre espèces de grandes et de courtes longévités. Si l'amplitude de la réponse aux changements de température en termes de HVA ou de proportion des AGHI diffère en fonction de la longévité, nous sommes contraints de définir à quelle température la comparaison est valable. Cela n'est pas une tâche facile puisque la température moyenne, sa variation et la fréquence des changements sont tous sujets à changer entre les espèces. L'exemple le plus frappant étant celui de la comparaison entre les *A. islandica* trouvées par 300 m de fond et *Mya arenaria* qui colonise l'étage intertidal. Il est ainsi possible que les différences d'IP entre espèces de bivalves de longévité différentes ne soient pas stables comme chez les mammifères, mais constamment changeantes. Si la relation inverse IP-longévité est un modulateur important de la longévité, alors nous devrions attendre que les différences d'IP entre espèces perdurent à travers une large gamme de température.

L'occurrence des changements lipidiques face au froid n'est toutefois pas observé chez tous les ectothermes. Les espèces qui entrent en dormance ou en quiescence pendant la saison froide opèrent un bien moindre changement, voire même aucun. La comparaison entre des espèces similaires de crustacés planctoniques d'eau douce montre que l'augmentation en AGHI n'est présente que chez celles qui restent actives durant l'hiver (Farkas 1979). Chez deux espèces d'écrevisse, le froid induit une augmentation de la teneur en AGHI membranaire, mais seule l'espèce qui reste active montre un changement de têtes polaires des phospholipides (Pruitt 1988). Chez *M. mercenaria*, une cessation du remodelage des AG consécutive à l'entrée dans une phase de quiescence hivernale pourrait expliquer les contradictions observées par les études précédentes. Les études de Pernet et al. (2006) et Parent et al. (2008) montrent une recrudescence des AGHI avec une descente de température de 20 à 8°C,

respectivement pour les phospholipides des tissus entier et des branchies. Par contre, l'étude de Gillis & Ballantyne (1999) ne trouve pas de changement au sein des membranes mitochondriales de branchies entre 12 et -1°C. Bien que les auteurs mentionnent certains changements de proportion d'AG, ceux-ci sont limités à certaines classes de phospholipides et sont annulés par un changement inverse dans les autres classes de phospholipides. Lorsque les AG des différentes classes de phospholipides sont considérées ensemble aucune différence significative ni tendance n'est observée. Ceci est surprenant compte tenu du fait que les membranes mitochondriales sont connues pour répondre plus fortement que les autres membranes cellulaires à un changement de température (Hazel & Williams 1990). Puisque cette espèce cesse toute activité de filtration en dessous d'une température de 7 °C (Ansell 1964; Ansell 1968; Grizzle et al. 2001), il convient de valider si le changement lipidique n'est pas limité à l'intervalle de température où les espèces restent actives. Bien que cette question ait une importance pour situer l'analyse de l'IP des bivalves, elle dépasse le cadre des études sur la longévité. Jusqu'à maintenant, les études avaient montré que les ectothermes qui ne restent pas actifs durant la saison froide diminuent ou suppriment le remodelage lipidique au froid. La question reste à éclaircir pour les espèces qui entrent en quiescence de façon facultative et dépendante de la température comme *M. mercenaria*. Il est possible que l'ajustement lipidique en réponse au froid soit finement coordonné au niveau d'activité global de l'organisme. Si c'est le cas, alors nous devrions pas voir de remodelage lipidique chez *M. mercenaria* si la température ne descend qu'à partir du seuil où l'espèce entre en quiescence.

Objectifs généraux et spécifiques

- ❖ Objectifs général du chapitre I : investiguer une possible association inverse ERO-longévité chez les bivalves marins en utilisant *A. islandica* et d'autres espèces du modèle. Investiguer les mécanismes responsables de cette moindre production d'ERO chez *A. islandica* afin de déterminer s'ils sont similaires ou différents de ceux trouvés chez les vertébrés de grande longévité.

L'intérêt de l'utilisation des bivalves pour répondre à ces questions dépasse largement le cadre de l'utilisation de l'espèce animale de plus grande longévité. La relation inverse ERO-longévité pourrait bien ne pas être observée chez ces organismes. Les mitochondries des invertébrés marins font face à des fluctuations majeures de pression partielle d'oxygène et de température qui provoqueraient de grandes fluctuations de production d'ERO chez les endothermes. Elles sont de plus exposées à des quantités variables de H_2S , lequel agit comme inhibiteur partiel de la cytochrome *c* oxydase pouvant exacerber la production de l'anion superoxide. Elles sont aussi exposées aux métaux de transition qui agissent comme catalyseurs de la réaction de Fenton produisant le très dommageable radical hydroxyle. Possiblement pour faire face à ces contraintes additionnelles, les mitochondries des bivalves sont pourvues d'une AOX. L'activité de cette composante additionnelle du STE est recrutée par les hautes pressions partielles d'oxygène (Tschischka et al. 2000). L'hypothèse directrice pour ce chapitre est que la production des ERO est plus faible pour les espèces de grande longévité dans toutes les lignées animales y compris les bivalves. Cette différence reflèterait un compromis attendu par la théorie évolutive du vieillissement de la pléiotropie antagoniste par lequel la production d'ERO est réduite chez les espèces de plus grande longévité au dépend d'une moindre capacité maximale de production d'ATP par unité du STE. Les mécanismes sous-jacent à ces différences seront les mêmes que chez les mammifères. Un moindre ratio des composantes en amont du STE (complexes I et II) sur celles en aval (complexe IV) amoindri le niveau de réduction électronique instantané des sites producteurs

d'ERO, mais diminue le flux d'électrons dans les STE. À cela devrait s'ajouter une plus grande activité de l'AOX, permettant d'abaisser la force proton motrice et donc la production d'ERO encore une fois aux dépens de la production d'ATP en augmentant la proportion de la consommation d'oxygène non-couplée.

- Objectif spécifiques du chapitre I:

- 1) Élever des individus de chacune de trois espèces du modèle dont les longévités sont les plus divergentes (*Mya arenaria*, *Spisula solidissima* et *A. islandica*) dans des conditions de température et nutrition identiques.
- 2) Mesurer la production d'ERO par le STE des mitochondries isolées pour les conditions de substrats utilisées dans les études précédentes, ainsi que pour la condition plus physiologique de convergence des électrons.
- 3) Mesurer l'activité de l'AOX des mitochondries isolées en respirométrie haute résolution (Oroboros O2K) par les approches complémentaires de la variation de PO_2 et de l'utilisation de l'inhibiteur spécifique SHAM.
- 4) Mesurer la consommation d'oxygène des mitochondries isolées en stade 2 et 3 par respirométrie haute résolution (Oroboros O2K).
- 5) Mesurer les capacités catalytiques maximales des composantes du STE (complexes I, II et IV) afin de détecter un différent ratio entre les composantes en amont et celles en aval.

- Prédiction

Si les mitochondries des bivalves suivent notre hypothèse, nous devrions trouver une moindre production d'ERO par le STE pour *A. islandica* que pour les deux autres espèces. Cette différence pourrait bien n'être significative que pour la condition de PIE, tel que souvent observé chez les vertébrés. L'activité de l'AOX sera plus grande

chez *A. islandica*. La consommation d'oxygène ne sera pas différente entre les espèces en stade 2, mais en stade 3 elle sera plus faible pour *A. islandica*. Conséquemment, la production d'ERO normalisée par la consommation d'oxygène sera moindre pour *A. islandica* en stade 2 mais pas en stade 3. Finalement, le ratio du complexe I/IV ainsi que II/IV sera moindre chez *A. islandica*.

- ❖ Objectifs général du chapitre II : investiguer une possible relation inverse IP-longévité chez les bivalves marins en utilisant les cinq espèces du modèle présenté. Comparer l'importance de cette relation entre les membranes mitochondriales et les autres membranes cellulaires.

Encore un fois, l'intérêt de la question dépasse largement le cadre du simple test de la relation chez l'espèce qui détient actuellement le record de longévité. Les bivalves possèdent une bien plus grande diversité de lipides (acides gras branchés, DMA, plasmalogènes et NMI) auxquels ils peuvent avoir recourt pour tempérer la susceptibilité à l'oxydation des membranes. Le calcul de l'IP tel qu'utilisé dans les études précédentes chez les vertébrés pourrait donc ne montrer aucune relation significative avec la longévité. L'hypothèse directrice pour ce chapitre est qu'une association inverse entre susceptibilité à l'oxydation des membranes et longévité se retrouve chez toutes les lignées évolutives animales. Par contre, les moyens pour y parvenir ne sont pas toujours les mêmes. Les bivalves devraient faire une utilisation des capacités antioxydantes des plasmalogènes et des NMI. L'hypothèse secondaire est que cette association inverse entre susceptibilité à l'oxydation et longévité est plus prononcée pour la membrane mitochondriale que pour les autres membranes. Ces hypothèses sont en accord avec la théorie de la pléiotropie antagoniste i.e. une moindre teneur en AGHI devrait conduire à une moindre efficacité catalytique des enzymes membranaires chez les espèces de grande durée de vie comme *A. islandica*.

- Objectif spécifiques du chapitre II:

- 1) Élever des individus de chacune des cinq espèces du modèle de bivalves dans des conditions de température et nutrition identiques.
- 2) Analyser la composition en chaînes carbonnées des membranes mitochondriales et non-mitochondriales des branchies par chromatographie sous phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
- 3) Comparer l'IP ainsi que la proportion des NMI et des plasmalogènes entre les espèces pour chaque source de membranes biologique et calculer les corrélations avec la longévité maximale.

- Prédications

Avec une augmentation de la longévité de l'espèce, nous devrions voir une diminution de l'IP et une augmentation de la proportion des plasmalogènes et NMI. Ces changements devraient être plus prononcés pour la membrane mitochondriale.

- ❖ Objectif général du chapitre III : investiguer l'influence des changements de température et de diète sur l'amplitude des différences en IP, plasmalogènes et NMI entre *A. islandica* et *S. solidissima*. Investiguer l'effet de l'âge sur l'IP chez *S. solidissima*.

Les ectothermes doivent ajuster leur composition lipidique en fonction de la température, ces changements devraient entrer en conflit avec une possible cible pour l'IP établie en fonction de la longévité. Aussi, il est peut-être beaucoup plus important de maintenir l'IP à une valeur basse et stable pour *A. islandica* que pour les autres espèces. Dans ce cas, *A. islandica* devrait montrer une réponse moins prononcées à la température et les différences interspécifiques d'IP s'en trouveraient modifiées. De plus, les AGHI sont des AG essentiels chez les

bivalves. Les changements de diète entre populations et pendant l'élevage sont susceptible d'affecter l'IP. Puisque *A. islandica* n'a pas des besoins aussi élevés en AGHI, elle est possiblement plus résiliente à l'effet de la diète. Ceci est d'autant plus possible que son métabolisme général est plus lent (Ridgway, Richardson & Austad 2011). L'âge est connue pour affecter l'IP chez les vertébrés. Il se peut que ce facteur s'ajoute aux autres pour influencer les différences d'IP entre bivalves de longévité différentes. L'hypothèse directrice pour ce chapitre est que l'IP n'est pas un trait physiologique aussi stable chez les bivalves de courte durée de vie que chez *A. islandica*. Il en résulterait des variations dans l'amplitude des différences d'IP entre celles-ci en fonction des conditions locales. La seconde hypothèse est que l'IP est un trait stable pendant la période de croissance asymptotique chez les bivalves, comme c'est le cas pour d'autres traits physiologiques.

○ Objectif spécifiques du chapitre III:

- 1) Élever des individus d'*A. islandica* et de *S. solidissima* à haute et basse température (12 et 2°C), avec long ou court jeûne hivernale.
- 2) Analyser la composition en chaînes carbonnées des membranes mitochondriales et non-mitochondriales des branchies par chromatographie sous phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
- 3) Comparer l'amplitude des changements de l'IP ainsi que de la proportions des NMI et des plasmalogènes entre les deux espèces pour chacun des traitements de température et de diète.
- 4) Faire des lectures d'âge dans les coquilles d'individus de *S. solidissima* de tailles très divergentes préalablement maintenues dans des conditions identiques de température et nutrition.

- 5) Investiguer des possibles corrélations entre l'âge et les variables de la composition lipidique des membranes, dont l'IP, en parallèle pour les membranes mitochondriales et les autres membranes.

- Prédications

L'amplitude de la différence d'IP entre les deux espèces devraient être plus grande aux températures froides où *S. solidissima* recrutera davantage les AGHI que *A. islandica*. La prolongation du jeûne hivernal devrait amoindrir les différences d'IP entre les deux espèces puisque *S. solidissima* sera plus affectée par une carence en AG essentiels que *A. islandica*. L'IP ne devrait pas changer en fonction de l'âge chez *S. solidissima*.

- ❖ Objectif général du chapitre IV : investiguer l'occurrence d'un remodelage lipidique induit par le froid pendant l'état de quiescence chez *M. mercenaria*.

Il est démontré que les ectothermes qui restent actifs pendant la saison froide opèrent un remodelage lipidique membranaire évident alors que ceux qui entrent en quiescence ou en dormance n'opèrent aucun changement ou un changement moindre. L'occurrence du remodelage lipidique induit par le froid chez les organismes à quiescence facultative n'a jamais été abordée. Cette acclimatation, médiée par un changement de proportion des lipides membranaires, pourrait bien être coordonnée à l'activité générale de l'organisme. L'une des cinq espèces du modèle de longévité présenté, *M. mercenaria*, entre en quiescence lorsque la température descend sous 7 °C dans le nord de son aire de distribution. Les individus présentent alors des signes de stress physiologique. L'hypothèse directrice de ce chapitre est que le remodelage lipidique n'est opéré que chez les ectothermes restants actifs peu importe si l'arrêt d'activité durant la saison froide est facultatif ou invariable.

- Objectif spécifiques du chapitre IV:

- 1) Élever des individus de *M. mercenaria*, *S. solidissima* et *A. islandica* à 12 et à 2°C en conditions identiques de nutrition.
- 2) Noter l'ouverture des valves de façon hebdomadaire durant tout l'automne et l'hiver chez les trois espèces.
- 3) Identifier les chaînes carbonnées des membranes mitochondriales et non-mitochondriales des branchies par chromatographie sous phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et les quantifier en détection par ionization de flamme.
- 4) Mesurer les hydroperoxydes lipidiques (LOOH) et le malondialdéhyde (TBARS) dans les branchies de *M. mercenaria*.

- Prédiction

Les individus de *M. mercenaria* devraient cesser de filter et maintenir les valves fermées sous le seuil de 7°C. Ils devraient présenter une recrudescence des marqueurs de peroxydation lipidique durant l'hiver en accord avec les observations d'études précédentes. Nous ne devrions trouver les signes de remodelage lipidique que chez *S. solidissima* et *A. islandica* et non pas chez *M. mercenaria*.

CHAPITRE I

LOW HYDROGEN PEROXIDE PRODUCTION IN MITOCHONDRIA OF THE LONG-LIVED *ARCTICA ISLANDICA*: UNDERLYING MECHANISMS FOR SLOW AGING

Daniel Munro, Nicolas Pichaud, Frédérique Paquin, Vincent Kemeid and Pierre U. Blier

Laboratoire de biologie intégrative, Département de Biologie, Université du Québec à Rimouski, 300 Allée des Ursulines, Rimouski, Québec, Canada G5L 3A1; (Daniel Munro: conception du projet, expérimentation et analyse des données, rédaction de l'article et conception des figures; N. Pichaud: aide à la conception du protocole de respiration à haute résolution, à l'utilisation des Oroboros (respiration à haute résolution) et à la rédaction; F. Paquin: protocole et expérimentation pour l'activité enzymatique; V. Keimeid: supervision pour l'activité enzymatique; Pierre U. Blier : aide à la conception du projet, supervision et aide à la rédaction de l'article.

Paru en 2013 dans *Aging cell*, vol. 12, p. 584-592. Les références citées dans l'article sont reportées à la fin de la thèse.

1.1 Résumé

La mise en évidence d'une relation inverse entre la longévité et le taux de production du H_2O_2 par les mitochondries représenterait un support important pour la théorie du vieillissement par le stress oxydant mitochondrial. Peu d'études ont tenté de mettre en évidence cette relation chez les invertébrés malgré l'importance de cette sous-division en terme de diversité taxonomique et de biomasse. Les mollusques bivalves représentent un groupe intéressant pour tester cette relation. Ils sont exposés à des contraintes environnementales telles que la présence de H_2S , les cycles d'anoxie/réoxygénation et les variations de température connues pour déclencher un stress oxydant dans les mitochondries d'endothermes. Le système de transport des électrons de leurs mitochondries possède une oxydase alternative pouvant soulager la production des ERO. Nous avons comparé la production de H_2O_2 des mitochondries isolées du manteau entre le métazoaire de plus grande longévité – le bivalve *Arctica islandica* – et deux espèces de taxonomie et de taille rapprochées. Pour élucider des mécanismes précédemment proposés comme étant responsables de la moindre production d'ERO chez les espèces longévives, nous avons comparé la consommation d'oxygène des mitochondries isolées et le taux d'activité enzymatique des complexes du STE entre les deux espèces dont la longévité diverge le plus. Nous avons trouvé une moindre production d'ERO par les mitochondries isolées d'*A. islandica* dans presque toutes les conditions de respiration testées incluant le PAE, le PIE et la CE. L'activité des oxydases alternatives ne semble pas expliquer ces différences entre espèces. En accord avec des études précédentes, nous avons trouvé qu'une moindre activité des complexes I et III chez *A. islandica* pourrait expliquer ces différences. Une moindre activité du complexe II pourrait également être impliquée.

1.2 Abstract

The observation of an inverse relationship between lifespan and mitochondrial H_2O_2 production rate would represent strong evidence for the disputed oxidative stress theory of aging. Studies on this subject using invertebrates are surprisingly lacking, despite their significance in both taxonomic richness and biomass. Bivalve molluscs represent an interesting taxonomic group to challenge this relationship. They are exposed to environmental constraints such as microbial H_2S , anoxia/reoxygenation, and temperature variations known to elicit oxidative stress. Their mitochondrial electron transport system is also connected to an alternative oxidase that might improve their ability to modulate ROS yield. Here we compared H_2O_2 production

rates in isolated mantle mitochondria among the longest living metazoan—the bivalve *Arctica islandica*—and two taxonomically related species of comparable size. In an attempt to test mechanisms previously proposed to account for a reduction of ROS production in long-lived species, we compared oxygen consumption of isolated mitochondria and enzymatic activity of different complexes of the electron transport system in the two species with the greatest difference in longevity. We found that *A. islandica* mitochondria produced significantly less H₂O₂ than those of the two short-lived species in nearly all conditions of mitochondrial respiration tested, including forward, reverse, and convergent electron flow. Alternative oxidase activity does not seem to explain these differences. However, our data suggest that reduced complex I and III activity can contribute to the lower ROS production of *A. islandica* mitochondria, in accordance with previous studies. We further propose that a lower complex II activity could also be involved.

1.3 Introduction

Senescence is progressive, endogenous, deleterious, irreversible, and ubiquitous in metazoan somatic tissues; however, the pace of this fundamental clock of cellular aging differs widely among species. The general hypothesis, stated as the “oxidative stress theory of aging,” suggests that the molecular basis of senescence resides in the accumulation of unrepaired damage inflicted by reactive oxygen species (ROS). Damage accrued to protein, lipid, and DNA would participate in the process, but particular emphasis is placed on damage to mtDNA (Kujoth et al. 2005; Pamplona 2011). Longevity differences would then depend on differences on rates of accumulation of ROS mediated-molecular damages. This concept has not been supported by comparative studies investigating antioxidant defences (Hulbert et al. 2007). However, there is evidence that the mitochondrial ROS production rate is lower in long-lived species (hereafter referred to the ROS–longevity relation; reviewed in Barja (2004a), and that these species possess macromolecules (such as lipids and proteins) with a better intrinsic resistance to oxidation (Hulbert et al. 2007; Munro & Blier 2012).

While the macromolecule resistance – longevity relationship is acquiring increasing experimental support, the same cannot be said of the ROS–longevity relation. Indeed, the promising early studies showing this relationship were confounded by the non-independence of body size and non-independence of phylogenetic distance among investigated species. More recently, Lambert et al. (2007) conducted similar experiments on 12 species and found that the ROS–longevity relationship was valid for heart mitochondria after correction for body mass and phylogenetic distances. However, this was true only when mitochondrial respiration was based on succinate, a substrate for complex II (CII), and not when complex I (CI) substrates were used. The use of succinate alone or in presence of inhibitors of complex III induces reverse electron flow (REF), and, as pointed out by Lambert et al. (2007), the relevance of this condition for determining *in vivo* metabolism is highly disputable. This is because in normal physiological conditions, mitochondria also oxidize CI substrates, such as pyruvate, glutamate, and malate, which induce forward electron flow (FEF). Even if early studies (reviewed in Barja, 2004a) associated longevity with low mitochondrial ROS production during FEF for heart and brain, three recent ones did not. These studies rather found no clear association for any conditions/organs with the sole exception, liver mitochondria in presence of succinate and rotenone, a conditions that confines ROS production at the level of complex III (Brown et al. 2009; Montgomery et al. 2011; Montgomery et al. 2012). Among invertebrates, the only study examining such the relationship (Sohal et al. 1995) used flies of very different body sizes, and only tested the condition in presence of succinate with inhibitors of complex III and no rotenone, which induces REF. Hence, additional studies are needed to establish the prevalence of this relationship in more physiological conditions of mitochondrial metabolism and its generalization among phyla.

Long-living bivalve molluscs are emerging longevity models (Abele et al. 2009) that represent a particularly interesting group of invertebrates to challenge the ROS–

longevity relation. Indeed, many species living in the intertidal zone face wide temperature variations and cycle through anoxia/reoxygenation as a function of the tide, which exposes them to oxygen and temperature variations that can elicit strong oxidative stress in homeotherm mitochondria. Furthermore, bivalves are often exposed to high concentrations of microbial H_2S that are capable of partly inhibiting complex IV (cytochrome *c* oxidase, CIV) activity (Abele et al. 2007), which could increase ROS production. This means that if the ROS production rate is associated with longevity in bivalves, then the relationship not only has a very remote origin in terms of evolutionary distance, but it also supersedes other physiological constraints imposed by the ecological niche, i.e., it is not limited to species with constant body temperature that are exposed to a stable oxygen partial pressure and chemical environment. Among these organisms, the mud clam *Arctica islandica* is of particular interest because of its extraordinary longevity. This species has long been known to be by far the longest-living non-colonial animal, and its maximum reported longevity (MRL) has recently been extended by the finding of a 507-year-old individual (Butler et al. 2013). Moreover, this species is known to undergo periods of burrowing during which it experiences near-complete anoxia without suffering from a burst of ROS production upon reoxygenation (Strahl et al. 2011), as observed after ischemia/reperfusion in mammalian mitochondria.

It is tempting to suggest that the capacity to face such challenges is partly linked to the presence of an alternative oxidase (AOX) in bivalve ETS. AOX is a dimer located in the inner mitochondrial membrane that transfers electrons from reduced quinone (coenzyme Q) to oxygen, thus bypassing CIII, without participating in proton pumping (van Dongen et al. 2011). Although AOX are cyanide- and antimycin-insensitive, they are specifically inhibited by salicylhydroxamic acid (SHAM) (reviewed in Lenaz & Genova, 2010). Their affinity for oxygen is much lower than CIV, and their recruitment requires a high degree of reduction of the Q-pool. Because of these last two characteristics, AOX is thought to represent a simple mechanism

that protects the organism against conditions known to elicit high ROS production rates; this would be achieved at the expense of maintaining futile proton cycling (Abele et al. 2007; Donaghy et al. 2012). For instance, AOX mRNA levels have been found to be up-regulated after 12 and 24 h of hypoxia and during reoxygenation (Sussarellu et al. 2013). A constitutively active AOX has been found for *A. islandica* (Tschischka et al. 2000; Abele et al. 2007), and the presence of this enzyme in all phyla possessing very long-lived species such as plants, fungi, and bivalves (Lenaz & Genova 2010) support its possible involvement in longevity.

Homeotherms and insects lack an AOX, and the reduced ROS production rate observed for long-lived species has been proposed to reflect adjustments at the level of ETS component stoichiometry and their regulation. In these species, the major ROS sources include CI, (Q-binding site or FeS clusters; (Lambert & Brand 2004a; Herrero & Barja 2000) and CIII (outer and inner centers; Brand (2010). Secondary sources include CII, glycerophosphate dehydrogenase, and ETF-dehydrogenase (reviewed in Brand, 2010). Some studies using substrates for complex I (CI; initiating forward electron flow, FEF) suggest that the rate of ROS production was lowered in long-lived species by consequence of a lower steady-state degree of electronic reduction of complexes I and III (Barja & Herrero 1998; Gredilla et al. 2001). Consequently, electrons remain a shorter time inside each complex, reducing the chances of deviating from their course to form superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$). When a substrate for CII is used (initiating reverse electron flow, REF), a reduced CI content has been proposed to explain the reduced ROS production rate (Lambert et al. 2010). Alternatively, maintaining a lower proton motive force (Δp) across the inner membrane has been related to reduced ROS production in long-lived species (Lambert & Brand 2004b; Lambert et al. 2010).

The present study aims to compare H_2O_2 production rates of isolated mitochondria from *A. islandica* and two short-lived, similarly sized, and taxonomically related

species, i.e., *Mya arenaria* (MRL = 28 years) and *Spisula solidissima* (MRL = 37 years). We also investigated if differences in H₂O₂ production among bivalves could be explained by the same adjustments in composition/regulation of the ETS proposed for homeotherms or if it relies on AOX. For this purpose, we measured mitochondrial respiration using high-resolution respirometry and enzymatic activities in the two species having the largest difference in MRL (*A. islandica* and *M. arenaria*).

1.4 Experimental procedures

1.4.1 Bivalve collection and care

Individuals of *A. islandica* and *S. solidissima* were collected in the Îles-de-la-Madeleine (47° 22'N, 61° 58'W, Québec, Canada) during May and August 2009. *M. arenaria* were collected in Bic (48° 23'N, 68° 40'W, Québec, Canada) during November 2010. All individuals were kept at the ISMER marine research station in Pointe-au-Père (Québec, Canada) before dissection in August-September 2011. The open flow-through two-tank system contained a 25 cm layer of sand that allowed normal positioning of bivalves in the sediments. Bivalves were fed a live microalgal diet consisting of *Nannochloropsis* sp., *Isochrysis galbana*, and *Pavlova lutheri* (12%, 44%, and 44% in cell numbers, respectively) provided at 1% body mass/d at 8°C; quantities were adjusted for water temperature fluctuations between 12°C (summer) and 3.5°C (winter).

1.4.2 Isolation of mitochondria

After water temperature had stabilized at 12°C for at least two weeks in the tanks, two individuals were brought to the lab each day for dissection. Bivalves were opened by inserting a knife blade in the siphon orifice, and about 4 g of mantle tissue were removed, rinsed, and minced for each individual. No tissues are postmitotics in bivalves as these are characterized by indefinite growth. We chose the mantle tissue

in accordance with previous studies generally using this tissue for mitochondrial respiration experiments. Our own pre-test revealed higher RCR for these mitochondria, with only slightly lower mitochondrial yield per gram of tissue than for gills, the only other tissue yielding mitochondria in sufficient abundance. Homogenization was achieved using three passes of a loose-fitting and one pass of a tighter-fitting pre-cooled glass/teflon pestle in 34 ml of ice-cold homogenization buffer (buffer compositions are available in the annexe A). The homogenate was centrifuged at 1,500 g for 10 min to eliminate large cellular debris; this step was repeated with the supernatant to remove remaining debris. The final supernatant was considered free of unbroken cells or cell debris and was centrifuged at 10,500 g for 15 min. The final mitochondrial pellet was gently resuspended in 1.8 ml of respiration buffer. All steps were carried out at 4°C. Hydrogen peroxide production measurements and oxygen consumption measurements were made using common buffer composition and substrate (and inhibitor) concentration. The common experimental temperature of 10°C was chosen as it is frequently experienced by individual of the three species in their population of origin, would allow sufficient rate of enzymatic activity, and would allow a security margin from heat stress since individuals were previously acclimated to 12 °C. Measurements were carried out in parallel immediately after mitochondrial isolation. The remaining mitochondrial isolates were frozen at -80°C for enzymatic assays of the ETS complexes, which were also carried out at 10°C. Protein concentrations in mitochondrial isolates were determined using the bicinchoninic acid assay kit (SIGMA®).

1.4.3 Mitochondrial hydrogen peroxide production

The hydrogen peroxide production rate was determined in an aliquot of the fresh mitochondrial isolate using a thermostated fluorometer (Hitachi F2500) set at 10°C and the Amplex red®/horseradish peroxidase (HRP) detection system (Invitrogen). The increase in fluorescent resorufin resulting from the HRP-catalyzed oxidation of amplex red by H₂O₂ was monitored at excitation/emission values of 560/587 nm.

Amplex red does not cross biological membranes and therefore reacts with H_2O_2 diffusing outside of the inner membrane. To ensure rapid conversion of superoxide anion released outside of the inner membrane (e.g. from complex III) into H_2O_2 , the assay is carried out in presence of an excess of superoxide dismutase (SOD). For this assay, the respiration buffer used for oxygen consumption measurements was added 6 μM amplex red, 2 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ horseradish peroxidase, and 50 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ SOD. Fluorescence signal was converted into H_2O_2 by referring to a standard curves built each day with an H_2O_2 standard in the buffer containing the same substrates and inhibitors concentrations. Substrate and inhibitor concentrations were: 10 mM succinate, 24 mM glutamate, 10 mM malate, 5 mM ADP, 1 μM antimycin A, and 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ oligomycin. To obtain linear rates of increase in fluorescence during ca 8-10 min, concentrations of mitochondrial proteins in the assay were adjusted between 62–233 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ as a function of conditions (substrates and inhibitors) and species. Results are presented as mean \pm SEM and normalized by citrate synthase activity. See annexe A for details of substrates and inhibitors additions over the course of each sequences, preliminary tests, and the rationale for using citrate synthase as the denominator.

1.4.4 Oxygen consumption

Oxygen consumption of freshly isolated mitochondria was measured using two thermostated high-resolution oxygraphs (Oxygraph O2K, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) operated simultaneously and held at 10°C. Sequences were initiated by the addition of ca 0.5 mg mitochondrial protein per ml to the respiration buffer containing substrates (24 mM glutamate, 10 mM malate, and 10 mM succinate when present). Sequential injections of inhibitors (1 μM antimycin, 1 μM rotenone, and 1 μM SHAM), uncoupler (1.5 μM FCCP), ADP (5 mM), and cytochrome *c* (50 μM) were performed during the course of the sequences. The maximal activity of CIV (CIV_{max}) was measured after addition of ascorbate (2 mM) and TMPD (0.5 mM). When measuring the AOX activity, chamber stoppers were temporarily raised and nitrogen or oxygen was introduced to achieve high (47.5 kPa) or low (8.6 kPa)

PO_2 . The choices of PO_2 values to reveal differences in AOX activity between species are based on Tschischka et al. (2000) that found significant increase in oxygen consumption of *A. islandica* mitochondria between 7 and 47 kPa, both during state 2 and 3, and both with glutamate or succinate. The respiration buffer and corresponding oxygen solubility coefficient were also taken from Tschischka et al. (2000), but adjusted to the experimental temperature of 10°C according to Rasmussen & Rasmussen (2003). Appropriate instrumental background corrections (O_2 consumption of the chamber probe as a function of O_2 concentration) to use were determined according to Oroboros guidelines, and independently for each sequence since they covered a different range of PO_2 . Chemical background (autoxidation of ascorbate/TMPD) and residual oxygen consumption corrections were used according to Gnaiger (2009) where relevant. The oxygen consumption rates were normalized with citrate synthase activity ($\text{pmol } O_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{U CS activity}^{-1}$). Protein concentrations were determined *a posteriori* in aliquots of respiration medium taken from respiration chamber after measurements. See annexe A for an annotated figure example of each type of sequence, and additional details about preliminary experiments, and calculation of free radical leak.

1.4.5 Enzymatic activity

Enzymatic activities of different ETS complexes and of citrate synthase were determined using a frozen aliquot of the mitochondrial isolate. Measurements were made in duplicate using a thermostated UV/VIS spectrophotometer (Ultrospec 2100 pro) held at 10°C. CIV activity was determined by measuring the oxygen consumption rate using Clark-type electrodes (Hansatech® instruments). Activity of the ETS complexes is presented as moles of electrons transferred per unit time and was normalized with citrate synthase activity, defined as mole of product formed per unit time. See the annexe A for details of this calculation and assay conditions.

1.4.6 Statistical analysis

To compare species within experimental conditions, significant effects ($\alpha = 0.05$) were determined by ANOVA (more than two species) or Student's *t*-test. Where ANOVA revealed a significant effect, Tukey-Kramer HSD was used to provide *P*-values for pair comparisons. Variables were \log_{10} transformed whenever homogeneity of variance could not be reached according to Brown-Forsyth test. *P*-values for these comparisons are presented in Figures 1.1–1.4. To compare all experimental conditions of H_2O_2 production within species, repeated measurement with the same individuals were assessed using a general linear mixed model (GLMM) with species and condition as the fixed effects and individual nested in species and as the random effects. When comparing AOX recruitment between species by manipulating PO_2 , Student's *t*-test comparisons were Bonferroni's corrected to account for the additional chance of finding a difference between species in either one of state 2 or 3 condition (repeated measurements with the same individuals). When the GLMM revealed a significant effect, Tukey-Kramer HSD was used to provide *P*-values for pair comparisons. *P*-values for comparison among conditions are presented in the text. In all cases, homogeneity of variance was estimated using the Brown-Forsythe test except when the GLMM procedure was used, in which case it was ascertained by visual examination of the residual distribution. All analyses were performed using the JMP v10.0 statistical package (SAS Institute Inc.) Results are presented as means \pm SEM. A table listing *F*-ratio, df, and *P*-value for the ANOVA and GLMM that preceded Tukey-Kramer HSD is available in annexe A.

1.5 Results

1.5.1 Size, age, and normalization

Bivalves were chosen by size to have individuals at the onset of or within the period of slow asymptotic growth phase for each species (Table 1.1).

Table 1.1 Life history traits of the three species investigated

Species	Common name	Maximum reported longevity (y)	Maximum size (mm)*	Size of collected individuals (mm)		Growth rate (K; VBGF) [‡]	References
				Range	Mean \pm SD		
<i>Mya arenaria</i>	Soft-shell clam	28	96	57–104	78.7 \pm 10.4	5.111	(Brousseau 1979; MacDonald & Thomas 1980; Giguère <i>et al.</i> 2007)
<i>Spisula solidissima</i>	Atlantic surfclam	37	130	119–136	125.0 \pm 7.8	0.269	(Sephton & Bryan 1990; Giguère <i>et al.</i> 2005)
<i>Arctica islandica</i>	Ocean quahog	507	103	80–94	88.7 \pm 4.5	0.052	(Roddick <i>et al.</i> 2007; Butler <i>et al.</i> 2013)

* *M. arenaria* and *S. solidissima*: maximum size reported from fishery management reports for the sampled population; *A. islandica*: maximum size reported for a near-by Canadian population.

[‡] For near-by populations. VBGF: Von Bertalanffy Growth Function.

1.5.2 H₂O₂ production rate of isolated mitochondria

The respiratory control ratios (RCR) of mitochondria were 1.8, 2.35, and 4.5, respectively, for *S. solidissima*, *M. arenaria*, and *A. islandica* when glutamate and malate were used as a substrate. As expected under the ROS–longevity relationship hypothesis, mitochondria from *A. islandica* produced much less H₂O₂ than those of the short-lived *M. arenaria* (MRL = 28 years) under all conditions tested. Figure 1.1 presents the results normalized by CS activity (A and C) and by CIV activity (B and D).

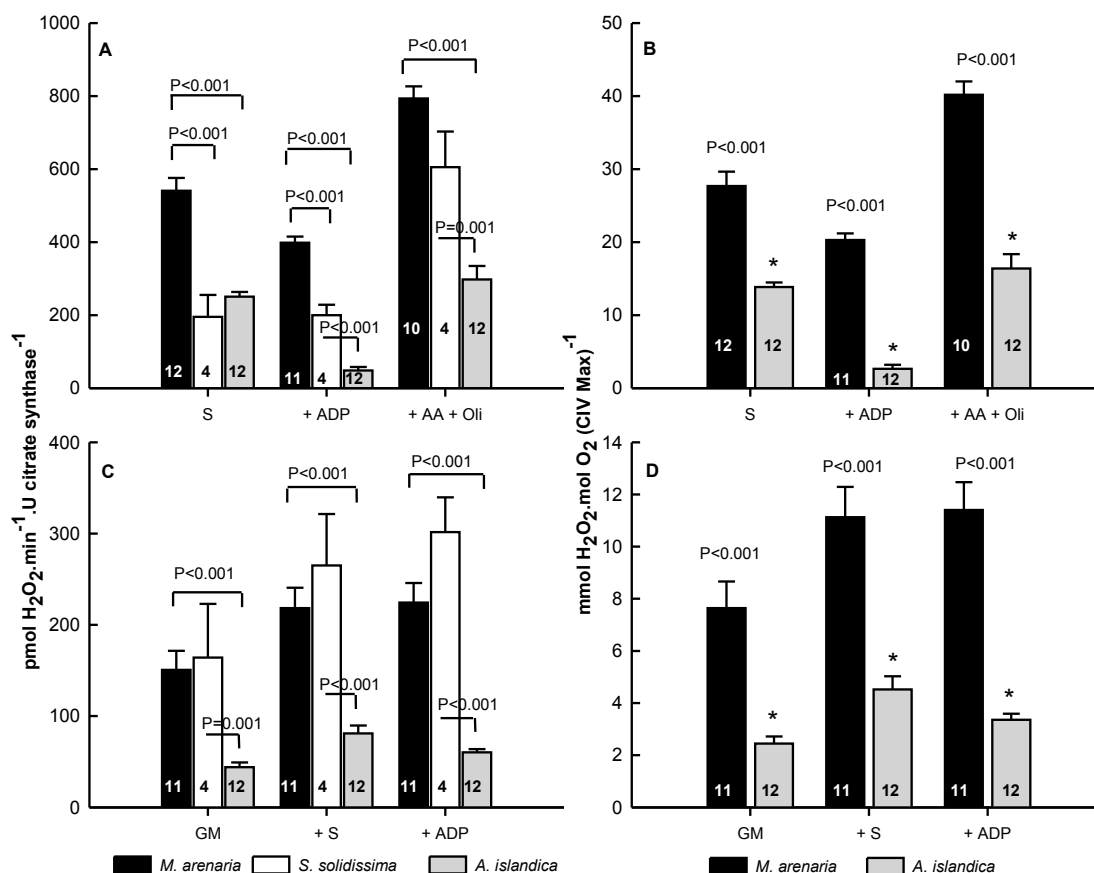


Figure 1.1 Hydrogen peroxide production of isolated mantle mitochondria. Results for the sequential addition of substrates and inhibitors (from left to right) are normalized with citrate synthase activity (A and C) and with CIV activity (B and D). Substrates: G = glutamate, M = malate, S = succinate; inhibitors: AA = antimycin A, Oli = oligomycin. Species are presented in order of increasing MRL from left to right: *M. arenaria* = 28 years, *S. solidissima* = 37 years, and *A. islandica* = 507 years. Values are means \pm SEM; sample size is indicated within bars. Significant differences are for Tukey's HSD (left panels) and *t*-test (right panels).

The largest relative differences were found during succinate-driven state 3. The production of H₂O₂ was also significantly lower for *A. islandica* than for *S.*

solidissima in all conditions tested, with the exception of succinate oxidation in the absence of ADP (state 2).

We found a significant interaction among species and conditions when data were normalized with CS ($F_{10;116} = 25.23$, $P < 0.001$). We thus performed post-hoc tests (Tukey's HSD) to further refine the analysis. The two species having the higher RCR values (*M. arenaria* and *A. islandica*) showed a different pattern across conditions compared with *S. solidissima*. Indeed, in the presence of substrate alone, H₂O₂ production was higher ($P < 0.001$) with succinate than with glutamate + malate for these species but not for *S. solidissima*. Furthermore, the addition of ADP during succinate oxidation significantly ($P < 0.001$) reduced the rate of H₂O₂ production for the same two species but not for *S. solidissima*. More generally, the condition of reverse electron flow (+ antimycin + oligomycin) resulted in significantly ($P < 0.001$) higher rates of H₂O₂ production than for any other conditions for *M. arenaria* and *S. solidissima*. It also resulted in the highest absolute value among conditions for *A. islandica* (Fig. 1.1 A). In contrast to what was found during succinate-driven respiration, the addition of ADP during convergent electron flow (after state 2 was monitored) did not discernibly lower the rate of H₂O₂ production (Fig. 1.1 C).

The parallel measurement of H₂O₂ production and of O₂ consumption in identical conditions of convergent electron flow allowed us to calculate the %free-radical leak (FRL). We present these results as the percent of O₂ diverted toward the formation of O₂[•] instead of being reduced to water. Compared with the short-lived *M. arenaria*, the FRL of *A. islandica* was significantly lower in both states 2 and 3 (Fig. 1.2).

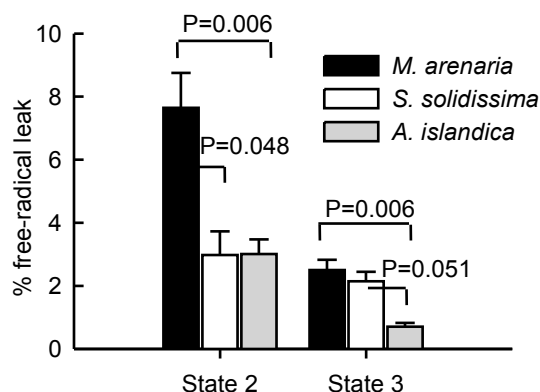


Figure 1.2 Free-radical leak expressed as the percent of oxygen consumption diverted to the production of hydrogen peroxide. Measurements of H_2O_2 production and O_2 consumption were performed at $10^\circ C$ during convergent electron flow (glutamate + malate + succinate) in both state 2 and state 3. Values are means \pm SEM for *M. arenaria* (n=11), *S. solidissima* (n=3), and *A. islandica* (n=8). Significant differences were determined by Tukey's HSD.

Compared with *S. solidissima*, no differences were observed during state 2. However, addition of ADP to enter state 3 largely reduced the FRL of *A. islandica*, resulting in a difference that just failed to reach significance, most probably because of the small sample size of *S. solidissima* individuals.

1.5.3 Oxygen consumption and enzymatic activity

To test previous hypotheses on the mechanisms allowing the reduction of ROS production rate in long-lived species, we measured the oxygen consumption of fresh mitochondrial isolates for the two species that showed the greatest differences in MRL and the most uniform differences in the rate of H_2O_2 production, i.e., *M. arenaria* and *A. islandica*. Measurements were performed using high-resolution respirometry (Oroboros O2K, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). The quality of the mitochondrial preparations was checked by the addition of cytochrome *c* during state 3 respiration. Results showed oxygen consumption increases of 11% for

M. arenaria and 5% for *A. islandica* (Fig. 1.3 A), which confirmed the intactness of the outer mitochondrial membrane (Kuznetsov et al. 2008) and the quality of mitochondrial preparation.

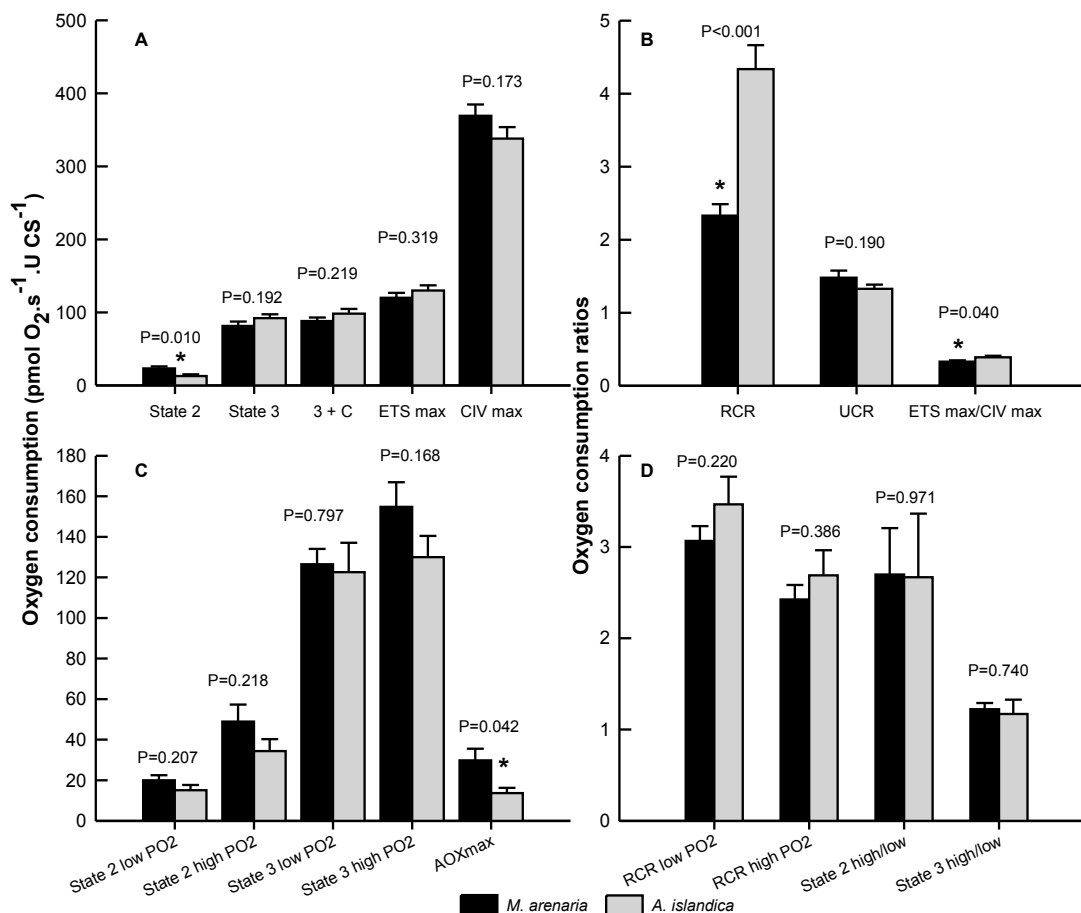


Figure 1.3 Oxygen consumption of mantle mitochondria. Measurements were made at 10°C and values normalized with citrate synthase activity. Oxygen consumptions in FEF (glutamate + malate) are presented in (A) and ratios in (B). Conditions for the sequential addition of substrates and inhibitors were as follows: state 2: glutamate + malate; state 3: addition of ADP; 3 + C: addition of cytochrome *c*; ETSmax: addition of the uncoupler FCCP; CIVmax: presence of TMPD, ascorbate, cytochrome *c*, and antimycin A. RCR: respiratory control ratio, UCR: uncoupling control ratio. Oxygen consumption during convergent electron flow is presented in (C) and ratios in (D). State 2: glutamate + malate + succinate; state 3: addition of ADP. High (47.5 kPa) and low (8.6 kPa) PO_2 are respectively above and below PO_2 saturation. AOXmax: maximal activity of the AOX (see text); RCR: respiratory control ratio. Ratio of oxygen consumption in high/low PO_2 is presented for both state 2 and state 3. Values are means \pm SEM. *A. islandica*, $n = 8$; *M. arenaria*, $n = 12$. *P*-values (Student's *t*-test) for comparison between species are indicated and significant differences are denoted by asterisks.

Oxygen consumption during glutamate + malate-driven state 2 was higher for *M. arenaria*, but no differences were found between the two species after the addition of ADP to initiate state 3 (Fig. 1.3 A). Accordingly, RCR were significantly higher for *A. islandica* (Fig. 1.3 B). The addition of FCCP to uncouple mitochondria and initiate maximum ETS activity (ETS_{max}) slightly increased the respiration rate in both species. This can be seen by the uncoupling control ratio (UCR) being slightly above a value of one which is indicative of some flux control exerted by the dehydrogenases or the complex IV. The addition of TMPD and ascorbate to measure maximal CIV activity (CIV_{max}) nearly doubled the rate of oxygen consumption. No differences were found between the two species for ETS_{max} and CIV_{max} (Fig. 1.3 A). However, when ETS_{max} was divided by the activity of CIV, the ratio was lower for *M. arenaria* (Fig. 1.3 B), suggesting a higher activity of either CI or CIII in *A. islandica*.

Results from enzymatic assays in frozen/thawed mitochondrial suspensions contrast with this last conclusion. Indeed, CI activity was much higher for *M. arenaria* compared to *A. islandica* when normalized both by CS activity (Fig. 1.4 A) and by CIV activity (Fig. 1.4 B).

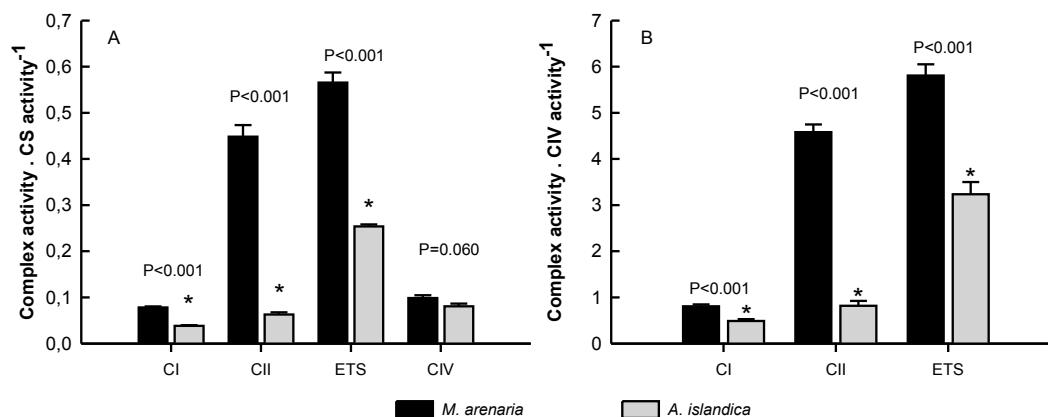


Figure 1.4 Enzymatic activities of the ETS components normalized with citrate synthase (A) and complex IV (B) activity. Abbreviations are as follows: complex I (CI), complex II (CII), complex I to III segment (ETS), and complex IV (CIV). Activities of the ETS complexes are expressed as moles of electrons transferred while that of the CS is per mole of product. Values are means \pm SEM for six mitochondrial preparations measured in duplicate. Asterisks denote significant differences (Student's *t*-test) between species.

Moreover, when the NADH – cytochrome *c* oxidoreductase capacity (CI and III) was measured (an assay confusingly named ETS assay even though CIV is not involved), the relative differences between species were exactly the same as observed for CI alone. Therefore, direct enzymatic activity measurements suggest both a higher CI/CS activity ratio and a higher CI/CIV activity ratio in the short-lived *M. arenaria*. Surprisingly, CII activity was about seven times higher for *M. arenaria* than for *A. islandica*, representing a much larger difference between species than for CI (Fig. 1.4).

1.5.4 Activity of the alternative oxidase

AOX is known to possess a lower affinity for oxygen than CIV. Therefore, its activity can be evaluated by manipulating the oxygen partial pressure (PO_2) (Tschischka et al.

2000). During convergent electron flow (glutamate + malate + succinate), increasing the PO_2 from low (8.6 kPa) to high (47.5 kPa, saturation being at 21.33 kPa) accordingly increased oxygen consumption for both species in state 2 (M.a.: $F_{1;11} = 22.83$, $P < 0.001$; A.i.: $F_{1;7} = 12.55$, $P = 0.009$ Fig. 1.3 C) and also for *M. arenaria* in state 3 ($F_{1;11} = 11.12$, $P = 0.007$; Fig. 1.3 C). Either for state 2 or 3, a high/low PO_2 oxygen consumption ratio above a value of one is indicative of AOX recruitment by elevated PO_2 (Fig. 1.3 D). Such ratio was close to three for state two for both species, but only a little over a value of one for state 3. This indicates preferential recruitment of AOX during state 2 and is in accordance with the recruitment being contingent to high degree of electronic reduction of the Q-pool. However, AOX recruitment capacities, estimated by such ratios were similar between species for each state, indicating no longevity-related differences between them in this regard (Fig. 1.3 D).

AOX capacities can also be estimated by using its specific inhibitor, SHAM. Since the enzyme requires a high degree of reduction of the Q-pool to be fully activated, we used a combination of CI and CII substrates. While maintaining a high PO_2 , we added antimycin A to block electron flow through CIII and added SHAM thereafter. Figure 1.3 C presents the absolute value of the decrease in oxygen consumption observed after the addition of SHAM. This value does not represent the relative contribution of the AOX to state 3 respiration because the use of antimycin A increases the degree of electronic reduction of the Q-pool and should increase the activity of the AOX. It rather estimates the maximal oxygen consumption that can be sustained by the AOX in optimal conditions of recruitment (AOX_{max}). The values obtained were not negligible compared to state 3 respiration, indicating that the enzyme was SHAM sensitive and could be highly active in optimal conditions. This supports that the increased oxygen consumption observed in either state 2 or 3 after increasing the PO_2 is explained by AOX recruitment. However, in contrast to the

hypothesis of a higher recruitment of AOX in the long-lived species, AOX_{max} was significantly higher for *M. arenaria* (Fig. 1.3 C).

1.6 Discussion

1.6.1 Hydrogen peroxide production

This study was designed to compare *A. islandica* with two taxonomically related shorter-lived species of similar body size found in an overlapping distribution range while controlling for differences in temperature acclimation and feeding conditions. The general finding is a reduced H₂O₂ production rate in mitochondria of the long-lived *A. islandica* compared to the two short-lived species. More specifically, *A. islandica* mitochondria had a lower rate of H₂O₂ generation when compared with *M. arenaria*, in all conditions of mitochondrial metabolism tested irrespective of the used of recombinant matrix (CS) or membrane bound (CIV) markers (Larsen et al. 2012). The difference further persisted after normalization by rate of oxygen consumption (FRL) for both states 2 and 3 convergent electron flow condition. We have not measured the actual P/O ratio, and thus cannot provide results normalized by rate of ATP production which would be representative of the actual capacity to lower rates of ROS production per amount of “mitochondrial work”. Nonetheless, we have good reasons to suggest that state 3 FRL differences between the two species would actually underestimate the difference that we would have found between species after calculating H₂O₂ to ATP ratio. We found that *M. arenaria* 1) has a lower RCR and higher state 2 oxygen consumption, suggesting a leakier membrane, 2) has a higher CII activity, suggesting less proton pumping by the ETS per O₂ consumed, and 3) has equal or higher AOX activity, again suggesting equal or less proton pumping by the ETS per O₂ consumed. All of these are indicators that less protons are available for the ATP synthase per unit of oxygen consumed in the short-lived species, either because of a more leaky membrane or more active non-proton

pumping components of the ETS. For this reason, it is reasonable to suggest that less ATP be produced per unit of oxygen consumed in the short-lived species are that normalization per unit of ATP produce would only increase the difference found between the two species. Therefore, mitochondria of *A. islandica* appear to be able to minimize the production of H₂O₂ for an equivalent amount of ATP provided to the cell (similar cell metabolic rate). This is in accordance with the hypothesis of a lesser steady state ROS flux toward mtDNA in long-lived species setting a slower pace for senescence.

When *A. islandica* is compared with *S. solidissima*, the rate of H₂O₂ generation was lower in the long-lived species for five out of six conditions when normalized with CS, including the most physiologically relevant ones, i.e., forward and convergent electron flow. However, no differences were found for succinate-supported state 2 or FRL state 2. Failure to find differences for these conditions may be related to the quality of the mitochondrial isolates for *S. solidissima*. We found RCR values of 4.5, 2.35, and 1.8, respectively, for *A. islandica*, *M. arenaria*, and *S. solidissima*. These values are comparable or higher to what was found in previous studies for *A. islandica* and *M. arenaria* (Tschischka et al. 2000; Philipp et al. 2005). However, no previous study is available to compare values for *S. solidissima*, and therefore we are unable to confirm if the relatively low RCR is a characteristic of the species (which is possible for bivalves) or if it is the sign of damaged mitochondrial membranes. If the inner membrane of *S. solidissima* mitochondria had been partially damaged during the isolation procedure, the result would have been the underestimation of the magnitude of the difference in ROS production rates between this species and *A. islandica* during succinate-supported state 2 (REF). H₂O₂ production during REF revealed highly sensitive to the proton gradient in all species tested so far (Herrero & Barja 1997a; Lambert & Brand 2004b). Here we observed this same sensitivity i.e. addition of ADP greatly reduced the rate of H₂O₂ production for the two species presenting normal RCR values and normal response to the addition of cytochrome *c*

during state 3. However, we did not observe it for *S. solidissima*. If the inner membrane was partially disrupted by the isolation procedures in *S. solidissima* the proton gradient would have been precluded to reach the normal high value of state 2. This would explain the lower RCR and the absence of a decrease in rate of H_2O_2 between succinate supported state 2 and 3. Partial disruption of the inner membrane would also have overestimated O_2 consumption during this condition (state 2) because of increased futile proton cycling. Abnormally high oxygen consumption would have underestimated FRL for this species in state 2 by increasing the magnitude of the denominator. Although we do not have direct indication that this is the case, we have strong indication that the outer membrane had been damaged by the isolation procedure. Adding cytochrome *c* during state 3 respiration is an easy test of the outer membrane integrity. An increase in oxygen consumption is indicative of a partial loss of this molecular shuttle from the intermembrane compartment (Kuznetsov et al. 2008). Exogenous source of cytochrome *c* therefore can reach the intermembrane compartment and restore normal shuttling capacity between complex III and IV and hence normal state 3 rate of oxygen consumption. A preliminary test with *S. solidissima* showed variables increases all in excess of 15% which is usually viewed as a reasonable threshold for considering the outer membrane as intact. Hence, there is a real possibility that for the two conditions where lower rates of H_2O_2 production was not found for *A. islandica* compared to *S. solidissima*, these rates were underestimated for the latter as a consequence of partial disruption the inner membrane during isolation procedures. Further refinement of the isolation procedure may thus well lead to the finding of significantly lower rate of H_2O_2 production for *A. islandica* in all conditions. We have no idea why our mitochondrial isolation protocol would have partially damaged membranes for this species and not for the others.

The finding of a generally lower H_2O_2 production rate in *A. islandica* mitochondria compared to shorter-lived species is in line with previous studies. In a preliminary study not subjected to peer review, (Buttemer et al. 2010b) reported that isolated

mitochondria of *A. islandica* produced less H_2O_2 than those of *M. arenaria* in states 2 and 4 (oligomycin). More recently, Ungvari et al. (2011) found lower rates of H_2O_2 and $\text{O}_2^{\cdot-}$ generation in tissue preparations of *A. islandica* when compared to the other quahog species, the hard-shell clam *Mercenaria mercenaria*. It seems therefore that the longest-living non-colonial animal, the mud clam *A. islandica*, is characterized by a reduced rate of ROS production when compared to shorter-lived species. This contrasts with a study of the longest-living rodent species, the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*). Indeed, endothelial and smooth muscle cells of the carotid artery were found to produce comparable or higher rates of $\text{O}_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 for the naked mole-rat compared to three shorter-lived rodents (Labinskyy et al. 2006).

Concerning bivalves as a group, studies on *A. islandica* agree with that of Philipp et al. (2005), who found that H_2O_2 production of isolated mitochondria from *M. arenaria* was higher than in the longer-lived *L. elliptica*. Taken together, these first studies provide evidence to suggest that the ROS–longevity relationship could very well exist for bivalves.

The FRL values found here for *M. arenaria* were much lower than what was found by Philipp et al. (2005). We found 7.8 and 2.2% respectively for state 2 and 3 while they found between 8 and 20% for state 2, and between 2.5 and 10% for state 3, depending on individual age. The reason for this discrepancy probably concerns the substrate used. Philipp et al (2005) used succinate in the presence of rotenone to measure rates of H_2O_2 production. Figure 1.1 shows that H_2O_2 production rates in this species were approximately double when using succinate alone than when using glutamate + malate + succinate (to initiate CE), and this remains true both for state 2 and 3. Our results of FRL presented in figure 1.2 have been calculated on the basis of H_2O_2 production in CE. Not surprisingly we found much lower values that are probably closer to physiological given the choice of substrates. Nonetheless, values for *M. arenaria* are generally high in both studies. Other bivalves species measured

here or in Philipp et al. (2005) were in the range of 2-5% depending on the state. Values commonly reported for vertebrates during state 2 are even lower than that i.e. usually <2% (Brown et al. 2009). The finding of slightly higher FRL values in bivalves than in vertebrates may be related to the use of experimental temperatures generally higher than what is found in the natural habitat for the reason of enhancing ROS production and detection capacities. While temperature such as the 10°C used here are still in the range of temperature experimented in natural populations, it is on the upper part of the distribution. Higher temperatures are well known to recruit high levels of ROS production rates in bivalves (Abele et al. 2002).

1.6.2 Mechanism for reduced hydrogen peroxide production rate

To explore possible mechanisms that allow a reduction of ROS production, we focussed on the contrast between *A. islandica* and *M. arenaria* since the differences between them were significant in all conditions tested.

We first examined AOX, which is an additional complex of the ETS of many plants, fungi, and animals. It has been proposed that it acts as an “electron overflow security,” reducing ROS production whenever the Q-pool is in a highly reduced state in the presence of elevated PO_2 (Abele et al. 2007). Such a mechanism may serve to avoid the burst of ROS production accompanying the reoxygenation of tissues with tidal exposure (*M. arenaria*) or upon emergence after burrowing in anoxic conditions (*A. islandica*; Strahl et al. 2011). Although they did not quantify the precise P_{50} for oxygen for the AOX of *A. islandica*, Tschischka et al. (2000) demonstrated that the increase in PO_2 from ca 7 to ca 47 kPa resulted in increased oxygen consumption for both state 2 and 3 in this species but not in bovin mitochondria measured in the same conditions. Here we also found evidence for an active AOX electron pathway in both species using this approach. We found increased oxygen consumption during both state 2 and state 3 with increased PO_2 . Further, we found SHAM sensitive respiration. By using antimycin A to inhibit CIII and achieved conditions known to maximally

reccruite the AOX, we observed a significant decrease in O₂ consumption after addition of SHAM. However, irrespective of the method used to measure it, the level of activity of the AOX was either similar or higher in the short-lived *M. arenaria* compared to *A. islandica*. Hence, we must rule out the possibility that higher AOX activity could explain the reduced ROS production rate of *A. islandica*.

In vertebrates, a lower CI content has been suggested as a simple explanation for the reduced ROS production rate of long-lived species (Lambert et al. 2010). CI content is also reduced in rat mitochondria after diet restriction treatments (Ayala et al. 2007; Caro et al. 2008). Complex I is known to be a major contributor to ROS production. When reverse electron flow is initiated by the combination of succinate and CIII inhibitors, the Q-pool is maximally reduced and electrons can only flow through CI. It is easily conceivable that REF maintains CI in a state of maximal reduction. It is therefore reasonable to suggest a direct relationship between CI content and the ROS production rate during this condition. In this study, we found a lower enzymatic CI activity in the long-lived *A. islandica* compared to the short-lived *M. arenaria*. We conclude that this difference can contribute to the lower ROS production observed during REF in *A. islandica*. This could act in parallel with other mechanisms such as the maintenance of a lower proton-motive force in this species (Lambert & Brand 2004b; Lambert et al. 2010). However, REF requires the use of inhibitors and does not simulate *in vivo* conditions.

During FEF, no inhibitors are used and CI and/or CIII are not maintained in a state of maximal reduction, at least in presence of ADP. It is nonetheless conceivable that a lower catalytic capacity of these complexes can reduce ROS production, explaining the differences observed between our species for this condition. We found that the higher enzymatic activity of CI and CIII does not translate into higher ETS_{max} in fresh mitochondrial isolate, suggesting that these ETS components are not limiting the capacity of mitochondria to oxidize substrates such as NADH and coenzyme Q.

However, higher enzymatic activity of these complexes may maintain a higher steady-state degree of electronic reduction at their ROS producing sites (Barja & Herrero 1998; Barja 2004). This would result in a higher ROS production rate for similar respiratory capacities. Notwithstanding, our data do not suggest that the maintenance of a lower proton gradient would reduce the rate of ROS production during FEF. Indeed, the addition of ADP during convergent electron flow had no detectable effect on ROS production rate. Furthermore, during preliminary experiments (data not shown), the addition of the uncoupler FCCP during convergent electron flow just slightly increased ROS production. This suggests that the rate of ROS production does not seem to be affected by the proton gradient when CI substrates are used.

Not only do our data generally support the involvement of CI content or activity in modulating ROS production between species, but they further suggest that CII activity may also be involved. Indeed, we found that CII activity is about seven times lower in *A. islandica* than in *M. arenaria*. This is a larger difference than the differences observed in the activity of CI, CIII, or any other parameters measured in this study. When succinate is present, higher CII capacities should maintain higher degree of electronic reduction of the Q-pool and hence of the ROS production sites of CI and CIII, leading to higher rate of ROS production. Furthermore, a recent study provides compelling evidence for high direct ROS production by CII in rat skeletal muscle mitochondria (Quinlan et al. 2012). A trend for a lower CII content was also found in long-lived strains of drosophila (Neretti et al. 2009). More strikingly, a 40% or 80% methionine restriction in rats both increased longevity and decreased CII content to a greater extent than the decreases found for any other complexes of the ETS (Caro et al. 2008). Though few in number, these studies clearly suggest that it may be worth investigating CII content in relation to longevity in future studies.

1.6.3 Conclusion and perspectives

The main finding of this study is that isolated mitochondria of the extraordinarily long-lived bivalve *Arctica islandica* are characterized by a reduced rate of ROS production when compared to two short-lived species. This difference does not appear to be linked to AOX capacity. However, a lower capacity of CI or CI and CIII may be involved, as previously proposed. Furthermore, we suggest that CII capacity or content should be measured by future studies since there is early evidence that it may be adjusted to modulate the overall ROS production of the ETS in long-lived species. We also showed that the state of mitochondrial respiration (substrate and inhibitor) influences the relative difference in ROS production found among species. In this regard, there is currently a lack of standardization between studies investigating the ROS–longevity relationship, and very few discussions have been focussed in this direction. We suggest that the condition of convergent electron flow in the presence of ADP (state 3) should be included (among others) in order to compare species on the basis of a respiratory state that best simulates *in vivo* conditions.

1.7 Acknowledgement

We are grateful to Véronique Desrosier for help in acquiring the H₂O₂ production data and to an anonymous reviewer who helped us further complement our literature review and position our study. Daniel Munro was supported by scholarship grants from NSERC and the FONCER program from Réseau Aquaculture Québec. This project was supported by an NSERC Discovery grant to P.U. Blier.

CHAPITRE II

THE EXTREME LONGEVITY OF *ARCTICA ISLANDICA* IS ASSOCIATED WITH INCREASED PEROXIDATION RESISTANCE IN MITOCHONDRIAL MEMBRANES

Daniel Munro and Pierre U. Blier

Laboratoire de biologie intégrative, Département de Biologie, Université du Québec à Rimouski, 300 Allée des Ursulines, Rimouski, Québec, Canada G5L 3A1; (Daniel Munro: conception du projet, expérimentation et analyse des données, rédaction de l'article et conception des figures; Pierre U. Blier : aide à la conception du projet, supervision et aide à la rédaction de l'article.

Paru en 2012 dans *Aging cell*, vol. 11, p. 845-55. Les références citées dans l'article sont reportées à la fin de la thèse.

2.1 Résumé

Les aldéhydes réactifs délétères libérés par la peroxydation lipidique des acides gras membranaires joueraient un rôle important dans le vieillissement. Ils engendreraient l'accumulation de mutations et délétions à l'ADNmt tout comme les ERO produits par le système de transport des électrons. Les études comparatives chez les mammifères et les oiseaux ont montré une relation inverse entre la susceptibilité à la peroxydation lipidique membranaire (indice de peroxydation, IP) et la longévité. Les bivalves marins sont un modèle de longévité émergent intéressant pour étudier cette relation puisque la présence de lipides atypiques chez ces organismes est susceptible de la complexifier. Nous avons investigué cette question en comparant le métazoaire ayant la plus grande longévité connue, la palourde *Arctica islandica* (longévité maximale = 507 ans), avec quatre autres espèces de palourdes sympatriques de moindre longévité (longévité maximale = 28, 37, 92, et 106 ans). Nous avons analysé la composition en chaînes carbonées (acyles et alkényles) des phospholipides des membranes biologiques des cinq espèces afin de comparer l'IP. L'analyse a été faite en parallèle pour les membranes mitochondriales et les autres membranes cellulaires prises ensemble. Pour les membranes mitochondriales, l'IP a montré une décroissance exponentielle avec la longévité alors que pour les autres membranes cellulaires, la décroissance était linéaire. Les valeurs d'IP d'*A. islandica* étaient significativement moindre que pour les autres espèces dans les deux cas. Ces résultats montrent clairement que l'IP décroît significativement avec la longévité chez les bivalves et qu'il décroît plus rapidement dans la membrane mitochondriale que dans les autres membranes cellulaires. Les valeurs particulièrement basses pour *A. islandica* pourraient faire parti des explications de la très grande longévité de cette espèce.

2.2 Abstract

The deleterious reactive carbonyls released upon oxidation of polyunsaturated fatty acids in biological membranes are believed to foster cellular aging. Comparative studies in mammals and birds have shown that the susceptibility to peroxidation of membrane lipids (peroxidation index, PI) is negatively correlated to longevity. Long-living marine molluscs are increasingly studied as longevity models, and the presence of different types of lipids in the membranes of these organisms raises questions on the existence of a PI-longevity relationship. We address this question by comparing the longest-living metazoan species, the mud clam *Arctica islandica* (maximum reported longevity = 507 y) to four other sympatric bivalve molluscs greatly differing in longevity (28, 37, 92, and 106 y). We contrasted the acyl and alkenyl chain

composition of phospholipids from the mitochondrial membranes of these species. The analysis was reproduced in parallel for a mix of other cell membranes to investigate if a different PI–longevity relationship would be found. The mitochondrial membrane PI was found to have an exponential decrease with increasing longevity among species and is significantly lower for *A. islandica*. The PI of other cell membranes showed a linear decrease with increasing longevity among species and was also significantly lower for *A. islandica*. These results clearly demonstrate that the PI also decreases with increasing longevity in marine bivalves and that it decreases faster in the mitochondrial membrane than in other membranes in general. Furthermore, the particularly low PI values for *A. islandica* can partly explain this species' extreme longevity.

2.3 Introduction

Polyunsaturated fatty acids (PUFA) of phospholipids that compose biological membranes are not only targets that are damaged by reactive oxygen species (ROS) but are also proposed to act as amplifiers of oxidative stress. Indeed, ROS are known to trigger the self-propagating autocatalytic process of lipid peroxidation among PUFA. A likely fate of the many peroxidized PUFA involved in such a process is to break down and release reactive carbonyl species (RCS). These can be viewed as secondary ROS that severely aggravate the cellular damage that would solely be accounted for by ROS. Indeed, RCS (e.g., MDA, acrolein, and 4-hydroxy-2-nonenal) can form adducts to proteins (advanced lipoxidation end products) and lipids that impede their functionality. They can also form exocyclic adducts to the G, A, and C bases of DNA (e.g., M1dG) with mutagenic potential.

The susceptibility of individual fatty acids (FA) to peroxidation is known to increase exponentially with increasing number of double bonds on the carbon chain and has been determined empirically for pure solutions of each of them (Holman 1954). This information allows the calculation of a single average value of susceptibility to peroxidation for any given biological membrane after conducting a lipid analysis; this value is referred to as the peroxidation index (PI). Comparative studies in mammals

and birds have shown the existence of a negative correlation between PI and species longevity using phospholipids of skeletal muscle and liver mitochondria (Hulbert et al. 2007). After correcting for unequal phylogenetic distances, the decrease in the ratio of n-3 to n-6 PUFA with increasing longevity remained significant (Valencak & Ruf 2007). Diet restriction studies also found that a lower PI value accompanies the increase in longevity (Ayala et al. 2007). Moreover, a recent phylogenomic study across 25 mammal species showed that genes controlling membrane lipid composition are positively selected in association with longevity (Richard et al. 2010). These complementary pieces of evidence are integrated into the membrane-pacemaker theory of aging (Hulbert 2005), which is a modification of the oxidative stress theory of aging that suggests cellular damages accrued from the release of RCS play an important role in aging (Pamplona & Barja 2011). However, nearly the entire body of evidence that substantiates this theory has been obtained from endotherms characterized by a simple phospholipid fatty acid composition. No interspecific comparisons have been made for invertebrates even though they represent more than 95% of all animal species and 99% of all animal biomass.

Many bivalve molluscs can attain old ages (often over 100 years old) and are increasingly appreciated as longevity models (Abele et al. 2009; Philipp & Abele 2009; Bodnar 2009). This group of invertebrates represents a very good test model for the membrane-pacemaker theory of aging. In temperate climates, these organisms experience very low and fluctuating body temperature over the year, which places a constraint on maintaining proper membrane fluidity for enzymatic activity. Hence, their membranes may have to incorporate high and constant levels of PUFA across species (Hazel 1995). Some bivalves also have to cycle through hypoxia and re-oxygenation (e.g., intertidal species) and have additional mitochondrial electron pathways (e.g., alternative oxidase, sulphide-oxidizing electron transport systems) that allow them to sustain hypoxia–re-oxygenation without a concomitant ROS

formation burst (Buttemer et al. 2010b). Lower susceptibility of membrane lipids could complement these systems in a manner that is independent of longevity.

More importantly, the membrane lipid composition of marine bivalves is largely different from that of endotherms and insects. First, they have considerable amounts of alk-1-enylglycerophospholipids, known as plasmalogens, in all organs (Kraffe et al. 2004). Plasmalogens differ from regular phospholipids in that the carbon chain of the *sn*-1 position is linked to the glycerol backbone by a vinyl ether linkage instead of the regular ester linkage. These alkenyl chains are often referred to as dimethyl acetal (DMA) from the name of the methylation product. In bivalves, most alkenyl chains are saturated and a few are monounsaturated (Kawashima & Ohnishi 2003), hence they all are essentially resistant to oxidation and, as is the case for saturated fatty acids, their presence will lower the PI value of a membrane. Furthermore, the plasmalogen-specific vinyl ether linkage is known to act as a ROS scavenger and breaker of auto-oxidation, and it is believed to confer *in situ* antioxidant protection in membranes (Yavin et al. 2002; Engelmann 2004; Kuczynski & Reo 2006), providing a potential mechanism to modulate the resistance to peroxidation independently of the PI value.

Marine bivalves also have significant amounts of non-methylene interrupted (NMI) FA in membrane lipids of all organs (Kraffe et al. 2004; Barnathan 2009). In these diene FA, the double bonds are separated by more than one methyl group, hence the sensitive *bis*-allylic methylene hydrogens found on regular PUFA are absent. This structural property greatly reduces the sensitivity to oxidation (Kaneniwa et al. 1988), and recruitment of these FA may offer bivalves an alternative means by which to reduce the PI value for similar double-bond indexes in the membrane (Barnathan 2009). Significant amounts of branched fatty acids of the 16 to 18 carbon chain length are also found in marine bivalves (Kraffe et al. 2004), which can affect the physical properties of the membrane (Kaneda 1991) without increasing the

susceptibility to peroxidation. Therefore, different constraints acting on membrane lipid composition and different possible solutions to reduce the susceptibility to lipid peroxidation might result in widely different patterns of the PI–longevity relationship in marine bivalves.

To test this question, we used the mud clam *Arctica islandica*, which attracted attention when a 405-year-old individual was found, making it by far the longest-living organism among metazoans (Wanamaker et al. 2008). Indeed, this maximum life span potential (MLSP) is almost double that of the second longest-living species reported, the bowhead whale *Dendroica mysticetus* (MLSP = 211 y; de Magalhaes & Costa 2009). During the writing of this article, this longevity record was increased by the discovery of another individual that had lived for more than half a millennium (507 y; Butler et al. 2013). In this study, we compared the gill membrane lipid composition of *A. islandica* with four other species of marine bivalves of the heterochonchia subclass: *Mya arenaria*, *Spisula solidissima*, *Mactromeris polynyma*, and *Mercenaria mercenaria*. Together, *A. islandica* and these species meet four conditions that make them a proper model for aging studies (Speakman 2005): overlapping areas of distribution, similar body sizes, members of close taxonomic groups, and greatly differing values of maximum reported longevity (MRL).

We further added a dimension to our test of the membrane-pacemaker theory of aging in bivalves by contrasting the change in lipid composition with longevity for the mitochondrial membrane vs. other cell membranes. Important developments of the oxidative stress theory of aging have indicated a major role for the accumulation of mutations to mtDNA during the onset and progression of senescence (Trifunovic et al. 2004; Kujoth et al. 2005). Within the cellular environment, the inner mitochondrial membrane is the major site of ROS production (> 95% of ROS) in normal physiological conditions (Brand 2010). For this reason, it should experience much greater lipid peroxidation than more distant cell membranes that are protected

from ROS by the action of antioxidants over the diffusion distance needed to reach the target. Lipid peroxidation in the inner mitochondrial membrane releases mutagenic RCS in close proximity to or in direct contact with the mtDNA, again precluding effective scavenging by antioxidants. For the membrane-pacemaker theory of aging to be in accordance with these developments, one would expect the mitochondrial membrane to present a steeper decrease in PI with increasing longevity compared to other cell membranes.

2.4 Experimental procedures

Bivalves used in this study were from populations located between the latitude 47° 15' and 48° 35' in the provinces of Quebec and New Brunswick, Canada. Individuals were obtained during summer 2009 and kept at the ISMER marine research station in Pointe-au-Père, Québec, Canada, in an open flow-through, two-tank system. In addition to the natural phytoplankton remaining in the semi-filtred (50 µm) water of the station, bivalves were fed a live microalgal diet (*Nannochloropsis* sp., *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*; 12%–44%–44% in cell numbers) at 1% body mass/d following a Q₁₀ of 2.5 adjusted at 8°C between April and December.

Individuals were sampled between December 2009 and April 2010, after water temperature in the tanks had stabilized at 4°C. Gills were removed from bivalves, rinsed with saline water, and maintained at 4°C while being thoroughly minced with a razor blade. Homogenization was achieved using three passes of a loose-fitting pre-cooled glass/teflon pestle in six parts ice-cold homogenization buffer. The homogenate was centrifuged at 1 250 g for 10 min and the supernatant was removed and conserved. The pellet was resuspended in 15 mL of homogenization buffer and centrifuged at 1 000 g for 10 min; this second supernatant was removed and the final pellet of cellular debris was conserved. The two supernatants were combined and a first centrifugation was run at 1 250 g for 10 min to eliminate residual debris. The

final supernatant was considered free of unbroken cells or cell debris and was centrifuged at 10 500 g for 15 min. The final mitochondrial pellet was resuspended in 150 μ L of homogenization buffer. All centrifugation steps were carried out at 4°C. Mitochondria and cellular debris were held at -80°C after nitrogen flush and until lipid extraction. We compared rates of NADH-INT (iodonitrotetrazolium) oxidoreduction reaction (combined assay for complexes I and III) between the biological fractions (mitochondrial pellet and cell debris). Activity was for cell debris was always below 1/20 and usually around 1/100 (or no signal) of that obtained for the corresponding mitochondrial pellet. We thus consider the cell debris to be significantly impoverished in mitochondrial membranes compared to the pellet meaning that PL lipid analysis of this fraction should mostly represent the lipids of other cell membranes.

Glycerophospholipids were separated from total lipid extracts using silica gel (60, mesh 150–230) microcolumns and trans-methylated using 10% boron trifluoride – methanol at 90°C for 45 min. All solvents used were ultra pure grade.

The resulting fatty acid methyl esters (FAME) and dimethyl acetals (DMA) were analyzed by GC-MS using a column with a high polarity stationary phase (HP-88 60 m, 0.25 mm \times 0.20 μ m). Calibration of the system was performed using regular FA mix standards, marine FA standards, and DMA standards. The preservation of intact DMA was verified using a standard of the pure plasmalogen PE (AVANTI Polar Lipids Inc, Alabaster, AL, USA) subjected to the same protocol. The peroxidation index (PI) is calculated as $PI = (0.025 \times \% \text{ monoenoics}) + (0.258 \times \% \text{ 20:2 NMI}) + (0.32 \times \% \text{ 22:2 NMI}) + (1 \times \% \text{ dienoics}) + (2 \times \% \text{ trienoics}) + (4 \times \% \text{ tetraenoics}) + (6 \times \% \text{ pentaenoics}) + (8 \times \% \text{ hexaenoics})$, including a single case of DMA among monoenes (Hulbert et al. 2007). Individual peroxidation index values for NMI are estimated from Kaneniwa et al. (1988).

Significant effects ($\alpha = 0.05$) were determined by ANOVA. Where ANOVA revealed a significant effect, Tukey-Kramer HSD was used to provide *P*-values for the differences among species. Homogeneity of variance was estimated using the Brown-Forsythe test, and variables were log10 transformed when necessary. Results are presented as means \pm SEM.

2.5 Results

2.5.1 Preliminary results and general lipid composition

While the five bivalve molluscs of the longevity model share similar body size, are of close evolutive lineage, and have overlapping areas of distribution, they widely diverge in their MRL. *Mya arenaria* has the shortest MRL (28), the three intermediate species (*S. solidissima*, *M. polynyma*, and *M. mercenaria*) have progressively increasing MRL, and *A. islandica* has an extreme MRL (Fig. 0.11). Differential centrifugation produced a cell debris fraction (low centrifugal force) and a mitochondrial fraction (high centrifugal force). The preliminary electron transport system assay (measuring the presence of mitochondrial enzyme) showed that cell debris are essentially devoid of mitochondria compared to the mitochondrial pellet (see experimental procedures in Annexe B). For this reason, cell debris can be considered to be representative of the various cell membranes minus mitochondrial membranes and hence offer a contrast for the mitochondrial membrane. Separation of the phospholipids followed by transmethylation produced fatty acid methyl esters (FAME) and dimethyl acetals (DMA), the latter being released from the *sn*-1 position of plasmalogens (Morrison & Smith 1964). Analysis by GC-MS allowed us to identify and quantify a total of 56 carbon chains (FAME and DMA); this included 27 straight-chain fatty acids, 4 branched fatty acids, 7 NMI, and 18 DMA. Many of these carbon chains were never found in amounts greater than 0.5% in any

species/biological fraction and were thus pooled in related groups (Tables 2.1 and 2.2).

Table 2.1 Fatty acid and DMA composition (mol%) of phospholipids from gill mitochondria.

	<i>M. arenaria</i> (n = 6) ^a	<i>S. solidissima</i> (n = 8)	<i>M. polynyma</i> (n = 9)	<i>M. mercenaria</i> (n = 8) ^a	<i>A. islandica</i> (n = 9)	P-value
9:0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	(NS)
14:0	0.9 ± 0.1 bc	1.1 ± 0.1 b	2.8 ± 0.3 a	0.3 ± 0.0 c	0.4 ± 0.1 c	<0.0001
15:0	0.5 ± 0.0 b	0.4 ± 0.0 b	0.9 ± 0.1 a	0.2 ± 0.0 c	0.3 ± 0.0 bc	<0.0001
16:0	12 ± 0.3 a	5.9 ± 0.3 c	8.3 ± 0.6 b	7.0 ± 0.3 bc	6.4 ± 0.4 c	<0.0001
16:1 n-7	2.9 ± 0.3 a	0.9 ± 0.1 bc	1.2 ± 0.1 b	1.1 ± 0.1 b	0.5 ± 0.0 c	<0.0001
17:0	1.5 ± 0.1 a	0.8 ± 0.1 b	0.9 ± 0.1 b	1.4 ± 0.1 a	1.4 ± 0.1 a	<0.0001
18:0	3.4 ± 0.0 a	4.9 ± 0.1 b	4.5 ± 0.4 b	5.4 ± 0.2 bc	6.3 ± 0.3 c	<0.0001
18:1 n-11	0.2 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 a	0.2 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 a	4.9 ± 0.3 b	<0.0001
18:1 n-9	3.3 ± 0.1 a	1.3 ± 0.1 bc	1.7 ± 0.2 b	0.9 ± 0.1 c	1.2 ± 0.1 c	<0.0001
18:1 n-7	0.9 ± 0.1 a	0.4 ± 0.0 b	0.3 ± 0.0 b	1.1 ± 0.1 a	1.1 ± 0.1 a	<0.0001
18:2 n-6	0.7 ± 0.1 a	0.3 ± 0.0 b	0.3 ± 0.0 b	0.2 ± 0.0 b	0.2 ± 0.0 b	<0.0001
20:1 n-11	4.0 ± 0.3 b	3.9 ± 0.1 b	8.4 ± 0.4 a	1.1 ± 0.0 c	0.1 ± 0.0 c	<0.0001
20:1 n-9	2.1 ± 0.2 b	2.2 ± 0.1 b	2.6 ± 0.1 a	0.5 ± 0.1 c	0.5 ± 0.0 c	<0.0001
20:1 n-7	2.3 ± 0.1 b	1.4 ± 0.0 c	2.7 ± 0.1 b	1.0 ± 0.1 c	3.1 ± 0.2 a	<0.0001
20:2 n-6	0.3 ± 0.0 a	0.5 ± 0.0 b	0.5 ± 0.0 b	0.6 ± 0.0 b	0.6 ± 0.0 b	<0.0001
20:4 n-6	7.3 ± 0.2 a	2.5 ± 0.1 cd	2.2 ± 0.2 d	4.2 ± 0.2 b	2.9 ± 0.1 c	<0.0001
20:5 n-3	9.5 ± 0.3 ab	8.7 ± 0.4 ab	10.9 ± 0.8 a	9.6 ± 0.5 ab	7.6 ± 0.3 b	0.0006
22:4 n-6	1.9 ± 0.5 ab	2.6 ± 0.1 a	0.8 ± 0.0 ab	2.3 ± 0.2 a	0.5 ± 0.0 b	<0.0001
22:5 n-6	2.4 ± 0.1 a	2.6 ± 0.2 a	0.9 ± 0.1 c	1.5 ± 0.1 b	0.9 ± 0.0 c	<0.0001
22:5 n-3	0.6 ± 0.0 a	3.0 ± 0.2 b	3.0 ± 0.2 b	1.5 ± 0.2 a	1.1 ± 0.0 a	<0.0001
22:6 n-3	19.0 ± 0.6 a	14.8 ± 0.6 b	15.4 ± 0.9 b	15.9 ± 0.6 b	12.0 ± 0.4 c	<0.0001
NMID 20:2 (Δ5,11)	3.4 ± 0.2 b	2.3 ± 0.1 b	3.6 ± 0.1 b	0.0 ± 0.0 d	9.8 ± 0.4 a	<0.0001
NMID 20:2 (Δ5,13)	1.0 ± 0.1 a	0.5 ± 0.1 a	0.5 ± 0.1 a	0.5 ± 0.1 a	4.2 ± 0.2 b	<0.0001
NMID 22:2 (Δ7,13)	0.2 ± 0.1 a	6.8 ± 0.2 c	1.5 ± 0.2 b	1.4 ± 0.1 b	0.0 ± 0.0 a	<0.0001
NMID 22:2 (Δ7,15)	0.0 ± 0.0 a	2.4 ± 0.1 b	0.0 ± 0.0 a	9.2 ± 0.4 d	4.5 ± 0.2 c	<0.0001
NMIT 22:3 (7,13,16)	0.0 ± 0.0 a	1.2 ± 0.1 b	0.1 ± 0.0 a	0.9 ± 0.1 b	0.0 ± 0.0 a	<0.0001
DMA 16:0	0.6 ± 0.0 b	0.2 ± 0.0 c	0.1 ± 0.0 d	1.2 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 d	<0.0001
DMA 17:0 iso II	0.4 ± 0.0 b	0.1 ± 0.0 bc	0.0 ± 0.0 c	2.3 ± 0.1 a	0.0 ± 0.0 c	<0.0001
DMA 17:0	0.3 ± 0.0 b	0.2 ± 0.0 bc	0.1 ± 0.0 c	1.0 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 c	<0.0001

DMA 18:0 iso I	0.5 ± 0.1 a	1.2 ± 0.1 b	0.5 ± 0.0 a	3.0 ± 0.1 d	1.4 ± 0.1 b	<0.0001
DMA 18:0	2.3 ± 0.1 a	9.3 ± 0.3 b	2.6 ± 0.2 a	11.5 ± 0.7 c	7.6 ± 0.3 b	<0.0001
DMA 19:0 iso	0.1 ± 0.0 a	0.3 ± 0.0 b	0.2 ± 0.0 a	0.7 ± 0.0 c	0.8 ± 0.0 c	<0.0001
DMA 20:1 iso II	0.1 ± 0.0 a	2.5 ± 0.1 b	0.1 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	<0.0001
DMA 20:1	11.8 ± 0.6 b	11.5 ± 0.4 b	18.5 ± 0.5 d	2.4 ± 0.1 a	16.2 ± 0.5 c	<0.0001
Branched FA ^b	1.0 ± 0.1 bc	0.6 ± 0.0 c	0.7 ± 0.0b bc	2.4 ± 0.1 a	1.1 ± 0.1 b	0.0001
Fatty acids < 0.5 % ^c	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.5 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.1	NS
SFA	19.7 ± 0.5 a	13.9 ± 0.5 b	19.2 ± 1.6 a	17.1 ± 0.5 ab	16.6 ± 0.9 ab	0.0023
UFA	63.0 ± 0.6 a	59.2 ± 0.4 ab	57.6 ± 1.6 bc	54.4 ± 0.1 c	56.5 ± 0.6 bc	<0.0001
MUFA	15.6 ± 0.2 a	10.1 ± 0.2 c	17.1 ± 0.5 a	5.7 ± 0.2 d	11.5 ± 0.3 b	<0.0001
PUFA	47.4 ± 0.6 ab	49.1 ± 0.6 a	40.5 ± 1.6 c	48.7 ± 0.9 ab	44.9 ± 0.7 b	<0.0001
n-6 PUFA	12.6 ± 0.6 a	8.7 ± 0.4 b	4.8 ± 0.2 c	9.1 ± 0.3 b	5.1 ± 0.1 c	<0.0001
n-3 PUFA	29.3 ± 0.8 a	27.0 ± 0.5 a	29.9 ± 1.4 a	27.4 ± 1.1 a	21.0 ± 0.5 b	<0.0001
n-3 PUFA (% PUFA)	61.9 ± 1.5 b	55.0 ± 0.6 c	73.6 ± 1.1 a	56.1 ± 1.3 c	46.7 ± 1.0 d	<0.0001
PUFA (without NMI)	41.9 ± 0.7a	35.7 ± 0.6b	34.6 ± 1.5b	36.4 ± 1.3b	26.1 ± 0.6c	<0.0001
NMI total	5.5 ± 0.3 a	13.4 ± 0.3 b	5.9 ± 0.3 a	12.2 ± 0.4 b	18.8 ± 0.6 c	<0.0001
NMI (% PUFA)	11.5 ± 0.7 a	27.3 ± 0.7 b	14.6 ± 0.8 a	25.3 ± 1.4 b	41.9 ± 1.1 c	<0.0001
DMA < 0.5 % ^d	1.2 ± 0.1 bc	1.4 ± 0.1 b	1.1 ± 0.1 a	6.4 ± 0.3 a	0.8 ± 0.0 c	<0.0001
Branched DMA (iso)	1.8 ± 0.1 ab	4.7 ± 0.2 c	1.2 ± 0.1 a	11.6 ± 0.4 d	2.4 ± 0.1 b	<0.0001
DMA total	17.3 ± 0.7 a	26.8 ± 0.5 c	23.2 ± 0.5 b	28.5 ± 1.2 c	27.0 ± 0.7 c	<0.0001
Unsaturation index	255.5 ± 3.1 a	236.9 ± 3.3 ab	230.0 ± 8.2 b	222.1 ± 6 bc	202.3 ± 2.6 c	<0.0001
Peroxidation index	267.9 ± 5.1 a	232.7 ± 4.6 b	229.3 ± 10.6 b	236.5 ± 8.4 ab	175.2 ± 3.7 c	<0.0001
MRL (years)	28	37	92	106	507	

Values are means ± SEM.

Carbon chains <0.5% are regrouped under straight-chain fatty acids <0.5%, DMA <0.5%, and branched fatty acids. MLSP: maximum lifespan potential.

^a Tissues from four individuals (*M. arenaria*) and two individuals (*M. mercenaria*) were pooled for each replicate.

^b Includes all branched fatty acids: (<1 %) 16:0 iso, 17:0 iso, and 18:0 iso; (>1%) 14-brch-16:0.

^c Includes the straight-chain fatty acids 10:0, 12:0, 20:0, 18:3 n-3, 20:3 n-6, 21:5 n-3, NMID 20:2 iso, and NMIT 20:3.

^d Includes the DMA 9:0, 15:0, 16:0 iso, 17:0 iso I, 18:0 iso II, 18:1, 19:0, 20:0, 20:1 iso I, and 20:2.

Values with different letters are significantly different (alpha = 0.05; Tukey's HSD); *P*-value from ANOVA; NS: no significant differences.

Table 2.2 Fatty acid and DMA composition (mol%) of phospholipids from gill cell debris.

	<i>M. arenaria</i> (n = 6) ^a	<i>S. solidissima</i> (n = 8)	<i>M. polynyma</i> (n = 8)	<i>M. mercenaria</i> (n = 8) ^a	<i>A. islandica</i> (n = 8)	P-value
9:0	0.1 ± 0.0	1.0 ± 0.5	0.7 ± 0.2	0.2 ± 0.0	0.8 ± 0.2	(NS)
14:0	1.1 ± 0.1 c	2.1 ± 0.1 b	3.6 ± 0.1 a	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.1 d	<0.0001
15:0	0.5 ± 0.0 b	0.7 ± 0.0 c	1.0 ± 0.0 d	0.2 ± 0.0 a	0.4 ± 0.0 b	<0.0001
16:0	12.9 ± 0.2 a	8.7 ± 0.4 b	9.1 ± 0.4 b	7.8 ± 0.2 b	8.9 ± 0.4 b	<0.0001
16:1 n-7	3.2 ± 0.1 a	1.3 ± 0.1 b	1.2 ± 0.2 b	1.6 ± 0.1 b	1.1 ± 0.2 b	<0.0001
17:0	1.2 ± 0.0 ab	0.9 ± 0.1 b	0.9 ± 0.1 b	1.2 ± 0.1 b	1.7 ± 0.1 a	<0.0001
18:0	4.0 ± 0.2 a	5.9 ± 0.2 b	5.3 ± 0.2 b	4.5 ± 0.1 a	7.6 ± 0.3 c	<0.0001
18:1 n-11	0.1 ± 0.1 a	0.1 ± 0.0 a	0.3 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 a	3.9 ± 0.1 b	<0.0001
18:1 n-9	3.8 ± 0.0 a	1.9 ± 0.1 b	1.8 ± 0.1 b	1.0 ± 0.1 c	1.9 ± 0.2 b	<0.0001
18:1 n-7	0.8 ± 0.0 a	0.5 ± 0.0 a	0.4 ± 0.0 a	1.3 ± 0.1 ab	2.1 ± 0.2 b	<0.0001
18:2 n-6	0.5 ± 0.0 a	0.4 ± 0.0 a	0.2 ± 0.0 b	0.2 ± 0.0 b	0.3 ± 0.0 b	<0.0001
20:1 n-11	4.8 ± 0.1 b	3.5 ± 0.1 c	7.4 ± 0.2 a	1.2 ± 0.0 d	0.1 ± 0.0 e	<0.0001
20:1 n-9	2.7 ± 0.0 a	2.5 ± 0.1 a	2.5 ± 0.1 a	0.6 ± 0.1 b	0.6 ± 0.0 b	<0.0001
20:1 n-7	3.1 ± 0.0 ab	1.8 ± 0.1 b	3.8 ± 0.1 a	1.3 ± 0.1 c	4.0 ± 0.2 a	<0.0001
20:2 n-6	0.3 ± 0.0 a	0.6 ± 0.0 c	0.4 ± 0.0 b	0.7 ± 0.0 d	0.6 ± 0.0 c	<0.0001
20:4 n-6	8.3 ± 0.1 a	2.6 ± 0.1 c	2.6 ± 0.2 c	4.6 ± 0.2 b	2.9 ± 0.1 c	<0.0001
20:5 n-3	7.1 ± 0.1 a	6.8 ± 0.5 a	9.9 ± 0.3 b	7.1 ± 0.3 a	8.0 ± 0.4 a	<0.0001
22:4 n-6	1.0 ± 0.1 b	2.3 ± 0.2 a	0.7 ± 0.0 bc	2.7 ± 0.2 a	0.4 ± 0.0 c	<0.0001
22:5 n-6	2.0 ± 0.1 a	1.9 ± 0.1 a	0.7 ± 0.1 c	1.5 ± 0.0 b	0.6 ± 0.1 c	<0.0001
22:5 n-3	1.3 ± 0.0 a	3.4 ± 0.1 c	3.5 ± 0.2 c	2.2 ± 0.1 b	1.2 ± 0.1 a	<0.0001
22:6 n-3	14.8 ± 0.2 a	14.5 ± 0.7 a	15.4 ± 0.6 a	13.3 ± 0.3 ab	11.6 ± 0.7 b	0.002
NMID 20:2 (Δ5,11)	3.3 ± 0.1 b	2.0 ± 0.1 c	3.1 ± 0.1 b	0.0 ± 0.0 d	8.1 ± 0.2 a	<0.0001
NMID 20:2 (Δ5,13)	1.0 ± 0.1 a	0.7 ± 0.1 a	0.7 ± 0.1 a	0.7 ± 0.1 a	3.4 ± 0.2 b	<0.0001
NMID 22:2 (Δ7,13)	0.0 ± 0.0 a	5.1 ± 0.2 c	1.2 ± 0.1 b	1.3 ± 0.1 b	0.1 ± 0.0 a	<0.0001
NMID 22:2 (Δ7,15)	0.0 ± 0.0 a	1.8 ± 0.1 b	0.0 ± 0.0 a	9.0 ± 0.3 d	3.4 ± 0.5 c	<0.0001
NMIT 22:3 (7,13,16)	0.0 ± 0.0 a	0.9 ± 0.1 b	0.1 ± 0.0 a	1.0 ± 0.1 b	0.0 ± 0.0 a	<0.0001
DMA 16:0	0.8 ± 0.0 b	0.3 ± 0.0 c	0.1 ± 0.0 d	1.4 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 d	<0.0001
DMA 17:0 iso II	0.5 ± 0.0 b	0.1 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 c	2.5 ± 0.1 a	0.1 ± 0.0 c	<0.0001
DMA 17:0	0.3 ± 0.0 b	0.2 ± 0.0 c	0.1 ± 0.0 d	1.1 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 cd	<0.0001
DMA 18:0 iso I	0.7 ± 0.0 b	1.1 ± 0.1 c	0.5 ± 0.1 a	3.2 ± 0 d	1.2 ± 0.1 c	<0.0001

DMA 18:0	2.5 ± 0.1 a	7.6 ± 0.2 b	2.6 ± 0.2 a	11.8 ± 0.5 c	6.1 ± 0.2 b	<0.0001
DMA 19:0 iso	0.1 ± 0.0 a	0.3 ± 0.0 b	0.1 ± 0.0 a	0.7 ± 0.0 c	0.7 ± 0.0 c	<0.0001
DMA 20:1 iso II	0.0 ± 0.0 a	2.3 ± 0.2 b	0.1 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	0.0002
DMA 20:1	13.7 ± 0.3 b	10.4 ± 0.4 c	16.5 ± 0.4 a	2.6 ± 0.1 d	14.3 ± 0.5 b	<0.0001
Branched FA ^b	1.0 ± 0.0 a	0.7 ± 0.1 a	0.9 ± 0.1 a	2.8 ± 0.1 c	1.4 ± 0.1 b	<0.0001
Fatty acids < 0.5 % ^c	1.2 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.0	1.3 ± 0.1	NS
SFA	20.9 ± 0.5 ab	20.5 ± 1.3 ab	22.1 ± 0.8 a	17.3 ± 0.3 b	21.8 ± 1.0 a	0.0026
UFA	59.1 ± 0.2 a	55.8 ± 1.0 b	56.8 ± 0.6 ab	52.4 ± 0.5 c	54.8 ± 0.8 bc	<0.0001
MUFA	18.5 ± 0.2 a	11.6 ± 0.2 c	17.5 ± 0.3 a	7.1 ± 0.3 d	13.6 ± 0.4 b	<0.0001
PUFA	40.7 ± 0.2 a	44.2 ± 0.9 ab	39.3 ± 0.6 a	45.3 ± 0.4 b	41.2 ± 0.8 ab	0.0003
n-6 PUFA	12.1 ± 0.2 a	7.9 ± 0.3 c	4.8 ± 0.1 d	9.9 ± 0.3 b	4.8 ± 0.2 d	<0.0001
n-3 PUFA	23.4 ± 0.3 bc	25.4 ± 0.9 b	29.2 ± 0.7 a	23.1 ± 0.3 bc	21.1 ± 0.8 c	<0.0001
n-3 PUFA (% PUFA)	57.6 ± 0.6 b	57.4 ± 1.4 b	74.1 ± 0.7 a	51.1 ± 0.5 b	51.2 ± 1.4 c	<0.0001
PUFA (without NMI)	35.5 ± 0.2a	33.4 ± 1a	33.9 ± 0.7a	33.0 ± 0.6a	25.9 ± 0.9b	<0.0001
NMI total	5.2 ± 0.1 a	10.9 ± 0.3 b	5.4 ± 0.2 a	12.3 ± 0.3 b	15.3 ± 0.6 c	<0.0001
NMI (% PUFA)	12.7 ± 0.2 a	24.6 ± 0.9 b	13.7 ± 0.6 a	27.1 ± 0.8 b	37.1 ± 1.6 c	<0.0001
DMA < 0.5 % ^d	1.3 ± 0.1 bc	1.4 ± 0.0 b	1.1 ± 0.1 cd	7.0 ± 0.1 a	0.8 ± 0.0 d	<0.0001
Branched DMA (iso)	2.2 ± 0.1 b	4.2 ± 0.2 c	1.0 ± 0.1 a	12.6 ± 0.2 d	2.1 ± 0.1 b	<0.0001
DMA total	20.0 ± 0.3 a	23.6 ± 0.6 b	21.1 ± 0.5 a	30.3 ± 0.6 c	23.4 ± 0.5 b	<0.0001
Unsaturation index	223.6 ± 1.3 a	219.6 ± 5.3 a	224.3 ± 3.8 a	203.4 ± 2.3 b	194.1 ± 4.6 b	<0.0001
Peroxidation index	221.8 ± 1.5 a	216.8 ± 6.8 a	225.3 ± 5.2 a	209.3 ± 2.9 a	172.4 ± 6.2 b	<0.0001
MRL (years)	28	37	92	106	507	

Values are means ± SEM.

Carbon chains <0.5 % are regrouped under straight-chain fatty acids <0.5%, DMA <0.5%, and branched fatty acids. MLSP: maximum lifespan potential.

^a Tissues from four individuals (*M. arenaria*) and two individuals (*M. mercenaria*) were pooled for each replicate.

^b Includes all branched fatty acids: (<1 %) 16:0 iso, 17:0 iso, and 18:0 iso, (>1%) 14-brch-16:0.

^c Includes the straight-chain fatty acids 10:0, 12:0, 20:0, 18:3 n-3, 20:3 n-6, 21:5 n-3, NMID 20:2 iso, and NMIT 20:3.

^d Includes the DMA 9:0, 15:0, 16:0 iso, 17:0 iso I, 18:0 iso II, 18:1, 19:0, 20:0, 20:1 iso I, and 20:2.

Values with different letters are significantly different (alpha = 0.05; Tukey's HSD); *P*-value from ANOVA; NS: no significant differences.

The general membrane lipid profile that we found is the same as that reported in previous bivalve membrane lipid analyses, e.g. docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) are very abundant relative to what is generally found in

endotherms, the 18:0 and 20:1 are the most abundant alkenyl chain (DMA) (Kawashima & Ohnishi 2003), and the 20:2 and 22:2 dienes the most abundant NMI (Kraffe et al. 2004).

2.5.2 Longevity and peroxidation sensitive fatty acids

Interestingly, the abundance of the highly unsaturated DHA markedly decreased with increasing longevity. This FA is the single most unsaturated, with six double bonds on the carbon chain, and is eight times more susceptible to peroxidation than FA with two double bonds and 320 times more susceptible than FA with one double bond (Holman 1954). In the mitochondrial fraction, DHA is significantly more abundant in the short-lived *M. arenaria* and significantly less abundant for the extremely long-lived *A. islandica* compared to the other species (Table 2.1, Fig. 2.1 A).

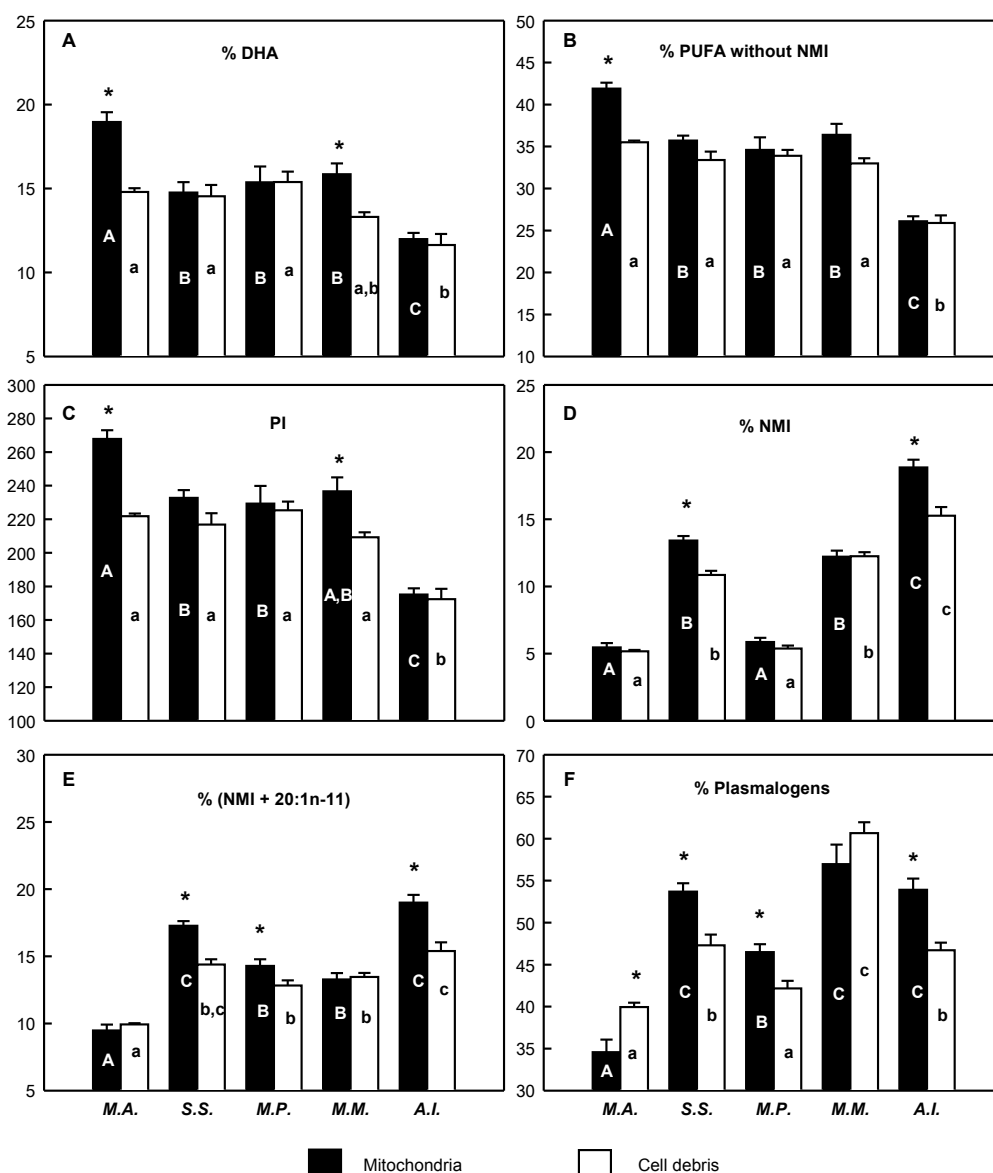


Figure 2.1 Key lipid composition indicators in mitochondrial membrane phospholipids (black bars) and cellular debris phospholipids (white bars) of the five bivalve species. DHA = docosahexaenoic acid, PUFA = polyunsaturated fatty acids, NMI = non-methylene interrupted fatty acids, and PI = peroxidation index. Species are presented in order of increasing reported maximum longevity from left to right. Capital and lower-case letters indicate significant differences among species for mitochondria and cell debris, respectively. Asterisks represent significant within-species differences between mitochondria and cellular debris. See Tables 2.1 and 2.2 for sample sizes and species longevity. Values are mean \pm SEM.

In contrast, this trend is much less pronounced in the cell debris fraction: the value for *M. arenaria* is not different from those species with intermediate longevity, and *A. islandica* is no longer different from at least one species with intermediate longevity (*M. mercenaria*). We plotted the mean DHA abundance for each species against their MRL and found a negative linear correlation for the cell debris ($R^2 = 0.774$, $P = 0.049$; Fig. 2.2 A). DHA abundance tended to decrease in mitochondria also, a better fit of the model was found when plotting DHA against the logarithm of the MRL (exponential decrease), but it could not reach significance ($R^2 = 0.688$, $P = 0.0824$; Fig. 2.2 A).

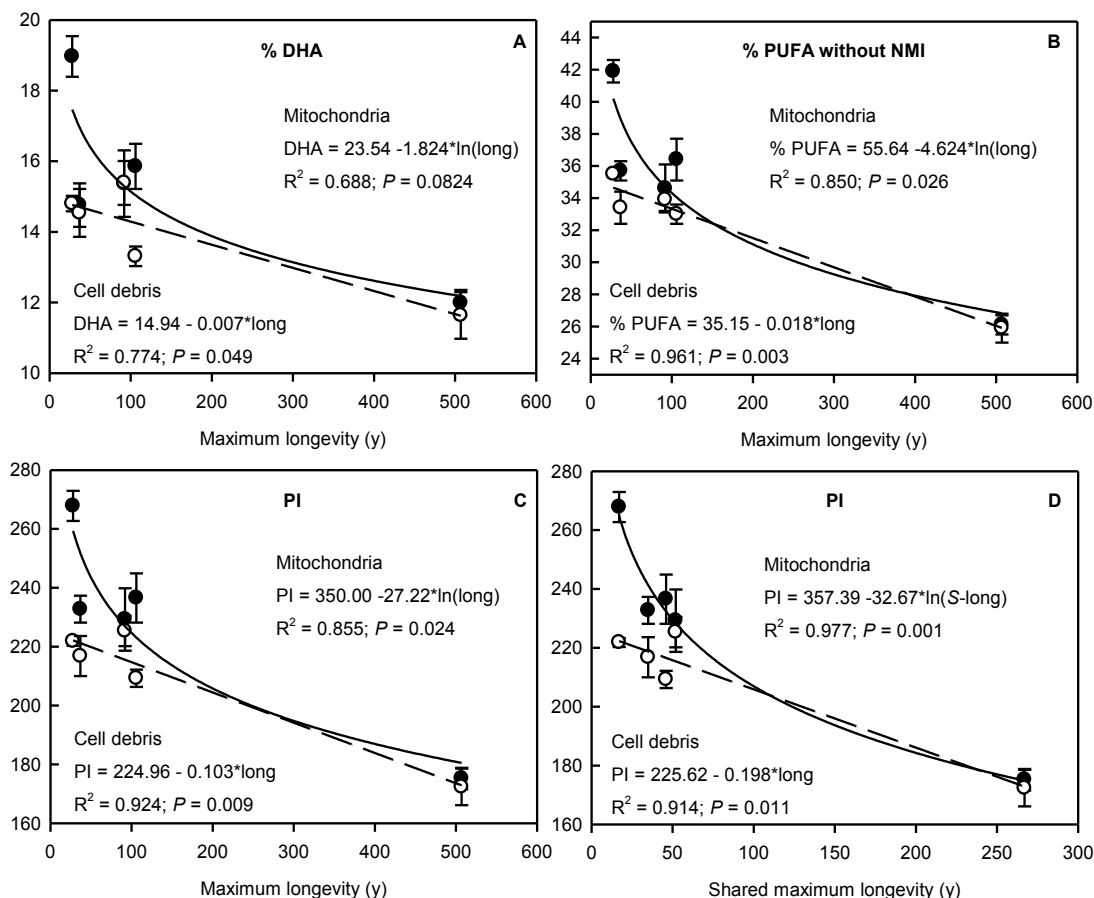


Figure 2.2 Relationships between % docosahexaenoic acid (A), % peroxidation-sensitive polyunsaturated fatty acids (B), and peroxidation index (C) and maximum reported longevity. The peroxidation index is also plotted against the longevity known to be attained in at least two populations of the species in (D). Data for gill mitochondrial membranes (black symbols, solid lines) and cellular debris phospholipids (white symbols, dashed lines) are presented with their best fitting model. See Tables 2.1 and 2.2 for sample sizes. Values are mean \pm SEM.

Taken separately, neither the n-6 PUFA nor the n-3 PUFA show any relationship to longevity, but their sum decreases with increasing MRL. In other words, the sum of all peroxidation-sensitive PUFA (FA class above the line in Fig. 2.3), which exclude NMI, decreases with increasing longevity.

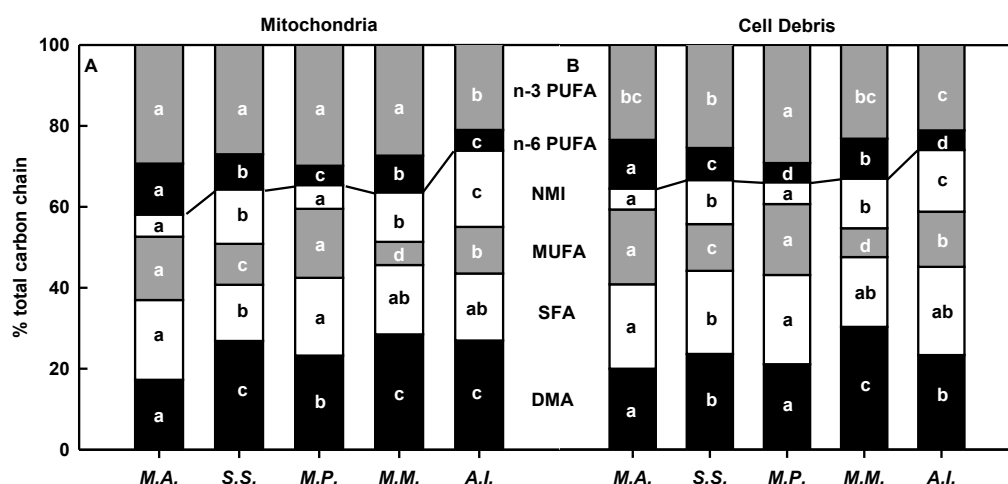


Figure 2.3 Carbon chain composition of mitochondrial (A) and cellular debris (B) phospholipids from bivalve gills. Species are presented in order of increasing reported maximum longevity from left to right. Letters indicate significant differences among species for each carbon chain class. Carbon chain classes are indicated on the figure: DMA = dimethyl acetals, SFA = saturated fatty acids, MUFA = monounsaturated fatty acids, NMI = non-methylene interrupted fatty acids, and PUFA = polyunsaturated fatty acids. The line delimits carbon chains that are resistant to peroxidation (below) and those that are peroxidation sensitive (n-6 PUFA + n-3 PUFA; above). See Tables 1 and 2 for sample sizes.

Similar to what was noted for DHA, this decrease is linear for the cell debris ($R^2 = 0.961$, $P = 0.003$; Fig. 2.2 B) and exponential for mitochondria ($R^2 = 0.850$, $P = 0.026$; Fig. 2.2 B). Individual comparisons reveal that in the mitochondrial fraction, the sum of all peroxidation-sensitive PUFA is significantly higher for the short-lived *M. arenaria* while it is significantly lower for the extremely long-lived *A. islandica* ($P = 0.014$ or lower in all cases; Fig. 2.1 B). In contrast, for the cell debris fraction, the difference is no longer significant for the comparison between the short-lived *M. arenaria* and the intermediate species but remains significant for the extremely long-lived *A. islandica* ($P < 0.0001$ in all cases; Fig. 2.1 B).

A lower abundance of DHA and peroxidation-sensitive PUFA in general will result in a lower PI value with increasing longevity. This is clearly what is found for the mitochondrial fraction, although the relationship is less pronounced for the cell debris fraction. Indeed, the resulting PI for the mitochondrial membrane is significantly higher for the short-lived *M. arenaria* compared to all other species, with the exception of the comparison with *M. mercenaria*, where it just fails to reach significance ($P = 0.058$; Fig. 2.1 C). It is also significantly lower for the extremely long-lived *A. islandica* compared to all other species ($P < 0.0001$; Fig. 2.1 C). However, for the cell debris fraction, there are no differences between the short-lived *M. arenaria* and the intermediate species, and only the value for the extremely long-lived *A. islandica* is significantly reduced compared to the other species ($P < 0.0001$; Fig. 2.1 C). Not surprisingly, when the mean PI for each species is plotted against their MRL, the decrease is linear for the cell debris ($R^2 = 0.924$, $P = 0.009$; Fig. 2.2 C) and exponential for the mitochondrial membrane ($R^2 = 0.855$, $P = 0.024$; Fig. 2.2 C).

The use of MRL may introduce a bias in estimating the relative longevity differences among species. MRL is known to differ among populations of bivalves of the same species (Basova et al. 2012), and efforts devoted to finding each species' longevity records are unequal. Shells of long-lived *A. islandica* individuals are valuable tools for reconstructing the ocean climate (Wanamaker et al. 2008; Butler et al. 2013), which has led to the search for the longest-lived individuals among populations of this species. Similarly, the growing interest in using bivalves as a longevity model has led to the search for the longest-lived *M. mercenaria* individual (Ridgway, Richardson, Enos, et al. 2011). In contrast, the three other species of bivalves that we used to build the longevity model have only been studied in the context of gathering information on life history traits such as estimating maturity at age, often for the purpose of fisheries management. This problem can be partly circumvented by searching for the MRL in different populations and using the second value in

decreasing order, a variable hereafter referred to as the shared maximum longevity (SML) since it represents the maximum longevity reported to be attained in at least two populations. After further examination of the literature, this value was found to be 17, 35, 46, 52, and 267, respectively, for *M. arenaria*, *S. solidissima*, *M. mercenaria*, *M. polynyma*, and *A. islandica*. Note that *M. mercenaria* and *M. polynyma* now exchange their position in the gradient of increasing longevity. This new method of evaluating the maximum longevity should be preferable since the interest of this study is not to find the best estimate of the maximum lifespan potential of each species, but rather to investigate the existence of a correlation between membrane PI and the frequently reached longevity in average populations such as those from which our individuals were sampled. Figure 2.2 D shows the results of such a re-examination. The cell debris PI still shows a linear decrease and the model fit is not much affected. The mitochondrial PI still decreased exponentially; however, the model fit is greatly improved, giving a remarkable correlation ($R^2 = 0.977$, $P = 0.001$). This might be much closer to the true relationship between longevity and membrane properties in the populations that we studied.

2.5.3 Non-methylene interrupted fatty acids

The abundance of NMI FA is included in the calculation of the PI value; however, this group of FA deserves particular attention since they have been suggested to offer antioxidant protection in membranes (Barnathan 2009). Indeed, empirically determined oxygen consumption (oxidation) for the most abundant NMI of our species translates into a much reduced individual PI value as compared to normal diene FA. From the results of Kaneniwa et al. (1988), we estimated the PI for NMI dienes to be 0.258 and 0.320 for the 20 and 22 carbon chains, respectively, while it is 1 for regular dienes. Therefore, NMI have the potential to lower the susceptibility to peroxidation for a minimal loss of membrane fluidity; hence, one could expect their recruitment to compensate for a decrease in peroxidation-sensitive PUFA in long-living species. We found the 20:2 NMI to predominate over the 22:2 in *M. arenaria*,

M. polynyma, and *A. islandica* while the opposite was found for *S. solidissima* and *M. mercenaria*. When all NMI are considered as a group, their abundance in both biological fractions is relatively low in the short-lived *M. arenaria* and significantly higher for the extremely long-lived *A. islandica* compared to all other species (Fig. 2.1 D). Despite this trend, no significant correlation between NMI and MRL or SML was found across all five species because the low values for *M. polynyma* do not fit. However, *M. polynyma* have significantly higher abundances of 20:1n-11 compared to all other species (Tables 2.1 and 2.2), and in endotherms, where NMI are absent, monoenes are often found to be recruited to compensate for the decrease in highly polyunsaturated fatty acids in long-living species. For this reason, we calculated the sum of all NMI and 20:1n-11 to see if this new variable would better correlate to longevity. In both biological fractions, the addition of 20:1n-11 FA does indeed improve the consistency of the trend (Fig. 2.1 E), but the models for positive correlation still do not reach significance either for MRL or SML. Nonetheless, for the mitochondrial fraction, NMI of either chain length or the 20:1n-11 FA appears to be the sole potential candidate acyl chains recruited to compensate for the decrease in highly polyunsaturated FA with increasing longevity in bivalves.

2.5.4 Plasmalogens

Plasmalogen abundance is not integrated into the calculation of the PI, and these lipids should be viewed as offering additional protection against peroxidation (Engelmann 2004; Kuczynski & Reo 2006). Within the mitochondrial fraction, plasmalogen abundance is significantly lower for the short-lived *M. arenaria* than for any other species, while it is among the highest for *A. islandica* (Fig. 2.1 F). However, this trend for an increasing abundance of plasmalogens with increasing longevity does not reach significance when modelled using either MRL or SML. Within the cell debris fraction, plasmalogen abundance does not show any relationship with longevity.

2.6 Discussion

We found that the peroxidation index (PI) of gill membrane lipids significantly decreases with increasing longevity in marine bivalves ranging from 28 to 507 y in MRL. Furthermore, when using a more conservative approach (maximum longevity shared by at least two populations) to estimate the maximum longevity attainable by our bivalve species, the relationship becomes remarkably precise for the mitochondrial fraction. We base these conclusions on a strong longevity model. First, all species of the model share similar body sizes, avoiding the possible allometric confounding factor that has been revealed for mammals (Couture & Hulbert 1995). Second, individuals were maintained for at least four months on a common diet and temperature regime. Third, the five species are from closely related taxonomic groups, with four from the same order and the fifth (*M. arenaria*) from the same subclass. This is particularly important since no data are currently available to build a proper phylogenetic tree (appropriate topology and realistic branch length) for these five species in order to apply corrections for phylogenetic non-independence (Garland et al. 2005). Nonetheless, the selection of closely related species is a way to better respect the assumptions of classical statistics that does not rely on any assumption in itself. First, it tends to reduce the amplitude of the phylogenetic signal to be corrected, and secondly, it tends to equilibrate the phylogenetic distance among species (tend toward star phylogeny). For these reasons, we remain confident in the conclusions of our study, which are based on strong *P*-values. It is important to note, however, that the significant correlation between DHA and longevity for the cell debris ($P < 0.049$) could very well become non-significant after IC correction.

2.6.1 Pattern of lipid remodelling with increasing longevity in bivalves

The PI decrease appears to be achieved by precisely controlling the ratio of peroxidation-sensitive PUFA (PUFA with two or more double bonds except NMI) to peroxidation-resistant alkenyl and acyl chains, the latter comprising saturated FA,

monoenes, and NMI. Previous studies in mammals and birds established the existence of an inverse correlation between PI and longevity for both the liver mitochondria and the total phospholipids in skeletal muscle. In these species, a recurring and important component of the shift for less unsaturated PUFA is the exchange of DHA for the monounsaturated 18:1n-9 FA. Monoenes have unique properties. The addition of the first double bond to a carbon chain only causes a limited increase in the susceptibility to peroxidation because the highly fragilized *bis*-allylic hydrogen atoms are only found when a methyl group is immediately flanked by two double bonds. On the other hand, by introducing a kink in the carbon chain, the addition of a first double bond brings the greatest contribution to the fluidity of the membrane while additional double bonds will have a lesser effect. Because lowering membrane fluidity is known to lower the activity of transmembrane enzymes and affect the maintenance of ion gradients across membranes (Else & Hulbert 2003), exchanging DHA for a monoene should represent an efficient compromise for achieving a reduced PI while maintaining functionality.

In bivalves, we also found that DHA systematically decreases with increasing MRL or SML, contributing approximately 46% to the total decrease in peroxidation-sensitive PUFA in gill mitochondria from the shortest-lived to the longest-lived species. However, the 18:1n-9 does not increase with increasing longevity and was never found in concentrations greater than 3.3%. Nonetheless, we found that the sum of NMI and 20:1n-11 FA presents a loose positive correlation to longevity in both fractions. As is the case for 18:1n-9, both the NMI and the 20:1n-11 represent an interesting compromise between fluidity loss and reduced susceptibility to peroxidation. The species-specific recruitment of one or a mix of these acyl chains might serve to compensate for the loss of highly polyunsaturated fatty acids with increasing longevity in long-living bivalves, much as the recruitment of 18:1n-9 seems to do in endotherms.

2.6.2 Mitochondrial membrane vs. Other cell membranes

The parallel analysis of mitochondrial membranes and of other cell membranes revealed a very interesting pattern. Even though the decrease in PI with increasing longevity is linear for the cell debris, an exponential decrease best describes the relation for mitochondria. A greater emphasis on increasing resistance to lipid peroxidation with longevity in the mitochondrial membrane as compared to other cell membranes would not be surprising given some basic cellular morphology and metabolic considerations. In normal physiological conditions, ROS are mainly produced by the electron transport system (mostly complex I and III) located in the inner mitochondrial membrane, and most ROS are released to the matrix side of this membrane (Brand 2010). In theory, this should subject the mitochondrial membrane to an immensely higher rate of lipid peroxidation than remote membranes, for which peroxidation can only be initiated by those ROS that can diffuse through the membrane, have a sufficient half-life to migrate a certain distance, and have not been intercepted by water-soluble antioxidants. The consequences of an elevated level of ROS attack to the inner mitochondrial membrane are not limited to the loss of functionality such as the loss of fluidity and increased permeability. The deleterious RCS released as the breakdown product of oxidized lipids have a much longer half-life than ROS and can diffuse through the membrane to reach remote targets. For these reasons, the mitochondrial membrane may be the key membrane acting as an amplifier of primary ROS by producing secondary ROS (RCS) (Hulbert 2005).

Furthermore, mtDNA is in close proximity or even in direct contact with the inner mitochondrial membrane and will consequently suffer a greater rate of attack both by ROS and RCS (Barja 2000). Mutations are known to accumulate on mtDNA with age and are believed to result in the gradual loss of ATP production capacity of mitochondria, which would account for a major part of the gradual and irreversible loss of physiological capacities that characterizes aging (Barja 2000; Pamplona 2011). This hypothesis has received strong support from a transgenic mouse model

that has a proof-reading-deficient version of the mtDNA polymerase gamma (*PolgA*^{D257A} mutants), which causes it to accumulate mtDNA mutations at a faster rate and display accelerated aging (Trifunovic et al. 2004; Kujoth et al. 2005). Like bivalve mitochondrial PI, the PI of mammalian membranes also show an exponential decrease with increasing longevity. Interestingly, when modelled with a power function, the liver mitochondrial membrane PI decreases with an exponent of -0.40 while that of the skeletal muscle phospholipids, which includes mitochondria as well as other cell membranes, decreases with an exponent of -0.30. This represents a 24% decrease in PI with every doubling in maximum lifespan for liver mitochondria compared with a 19% decrease for the skeletal muscle phospholipids (Hulbert et al. 2007). Although these are two distinct organs, it is tempting to conclude that the PI decreases more abruptly with longevity for the mitochondrial membrane. When comparing a senescence accelerated to a senescence-resistant mice strains, Choi et al. (1996) only found an association between low PI and longevity in the mitochondrial membrane, not in microsomes.

2.6.3 Bivalves vs. Mammals

It is interesting to compare the gill mitochondrial membrane PI value that we found for bivalves to the predicted value for liver mitochondria of similarly long-lived mammals using the equation in Hulbert et al. (2007). Considering *M. arenaria* (MRL = 28) and *A. islandica* (MRL = 507), which are the extremes of the longevity gradient, we found values of 268 and 175 respectively. The PI for the liver mitochondrial membranes of mammals is calculated as $PI = 475 * \text{maximum longevity}^{-0.40}$, which gives values of 125 and 39, respectively, for the corresponding longevity. A higher PI value in bivalves than in mammals of similar longevity should not be interpreted as a denial of the membrane-pacemaker theory of aging for many reasons. The most obvious one is the presence of a high relative proportion of plasmalogens in bivalve tissues that will reduce susceptibility to peroxidation independently of the PI value. A review article on plasmalogens (Engelmann 2004)

concludes that they satisfy the criteria for the definition of a lipophilic antioxidant and protect membranes from lipid peroxidation. It has been proposed that the relative high abundance of plasmalogen in the human brain and nervous tissues could explain the tolerance for a concomitant high level of DHA in neuron membranes (Yavin et al. 2002). *In vivo* evidence of this has been found in the rat brain (Kuczynski & Reo 2006), and plasmalogen deficiency in the human brain is associated with premature aging, Down syndrome, and Alzheimer's disease (Nagan & Zoeller 2001; Grimm et al. 2011). Bivalve cell membranes displays similarities with membranes of vertebrates nervous tissue, both are rich in DHA and have elevated levels of plasmalogens, particularly in the gills (Kraffe et al. 2004; Nevenzel et al. 1985). Here we found an average of 49.1% plasmalogen in the gills of our bivalves. When compared to the average 20% proportion found in the adult human brain (Farooqui & Horrocks 2001), these levels are suggestive of a very important additional protection against lipid peroxidation.

Mammalian liver mitochondria also differ from bivalve gill mitochondria in the rate of decline of the PI value with increasing longevity. When the relation between mitochondrial membrane PI and SML of our bivalves is modelled with a power function, we find an exponent of -0.15 while that of the liver mitochondria of mammals reported in Hulbert et al. (2007) is -0.40. Thus, with every doubling in longevity, the PI of the mitochondrial membrane of the bivalve gills is reduced by 11% while it is reduced by 24% for mammal liver mitochondria. Once again, plasmalogens can account for this difference since the content of these lipids increases irregularly but markedly in gill mitochondria from the short-lived *M. arenaria* to the extremely long-lived *A. islandica*, ranging from 34.6% to 54%. Therefore, the increasing abundance of plasmalogens might compensate for a lower rate of decrease in PI to achieve the same resulting decrease in susceptibility to peroxidation with increasing longevity. Unfortunately, we are not aware of any common denominator by which to compare the influence of the PI and of the

abundance of plasmalogens on the resulting global susceptibility to peroxidation of a membrane. Interestingly, when the long-living naked mole rat (*Heterocephalus glaber*) was compared to the laboratory mouse (*Mus musculus*), a higher abundance of the plasmalogen form of phosphatidylcholine was found in the skeletal muscle, heart, liver, and liver mitochondria glycerophospholipids, and the same was also true for the phosphatidylethanolamine fraction in skeletal muscle and liver (Mitchell et al. 2007). Future research on the PI-longevity relationship should include a complete integration of plasmalogens when using such organs as the heart and brain or when using longevity models that possess high amounts of plasmalogens in all organs. Failure to do so would result in the biased estimate of the actual PI by failing to include the alkenyl chains (DMA) and would ignore the additional protection conferred by the vinyl ether linkage. For instance, this omission may partly explain why a consistent relationship between membrane PI and longevity was not always found in previous studies addressing this question for the mammalian brain. Alkenyl chains of plasmalogens can be included in the total carbon chain analysis under the form of DMA which are readily identified by GC-MS and quantified by GC-FID. On the basis of one DMA chain per plasmalogen phospholipid, the proportion of plasmalogens among phospholipids can be deduced from the proportion of DMA among chains. Hence both the contribution of alkenyl chain to PI and proportion of antioxidant vinyl ether bond can be appreciated when comparing species.

A lower rate of ROS production in marine bivalves can also account for the difference in PI values for similar longevity. The membrane-pacemaker theory of aging does not propose that increased longevity is achieved by a lower PI value *per se*, but rather by the resulting lower damage accrual to membranes and a lower rate of RCS production that should accompany lower PI values when everything else is equal. However, Buttemer et al. (2010) reviewed the literature and found that the ROS production rate of isolated mitochondria is on average an order of magnitude lower for marine bivalves compared to mammals. For instance, it is reported that the

succinate-driven state III rate of H_2O_2 production is $0.144 \pm 0.14 \text{ nmol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$ for *M. arenaria* mantle mitochondrial and even lower for *A. islandica* mantle mitochondria while it ranges between 2 and $2.8 \text{ nmol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$ in rat heart mitochondria. Therefore, during normal physiological conditions, a lower body temperature coupled with a lower ROS production rate might result in a lower *realized* peroxidation rate in bivalve mitochondria despite higher PI values.

2.6.4 Conclusion and perspectives

We have shown that PI values for bivalve gill mitochondrial membranes follow an exponential decrease with increasing species longevity, as was found for liver mitochondria and skeletal muscle phospholipids in mammals and birds; this finding definitely excludes the possibility of a mechanism that is limited to endotherms or vertebrates. Moreover, the fact that 1) the PI–longevity relationship also exists in bivalves even though they face additional constraints believed to act on membrane lipid composition and that 2) the lipid remodelling is partly achieved using different types of lipids (and hence different enzymatic pathways) in these organisms are two important observations. They support the membrane-pacemaker theory of aging as a general and fundamental determinant of longevity. The distinct PI–longevity relationship found for mitochondria (exponential decrease) and other membranes (linear decrease) suggests that an increase in longevity primarily results from decreasing lipid peroxidation in the mitochondrial environment. In addition, our results suggest that high levels of plasmalogens could provide DHA-rich tissues with a protection against lipid peroxidation in a similar manner for bivalve and mammalian nervous tissues. Finally, the significantly lower PI and elevated levels of plasmalogens found for *A. islandica* mitochondria should be a prime factor contributing to this species' extraordinary longevity. Further research is necessary to incorporate the PI value and plasmalogen abundance into a single metric representing the overall susceptibility to peroxidation of a membrane in order to include various organs and organisms within a single means of evaluating the susceptibility to

peroxidation. Survey on other species of veneridae and construction of robust phylogenetic trees will allow delineating the phylogenetic signal in the establishment of the relationship between structural properties of mitochondrial membranes and animal longevity. Our laboratory is currently working to sequence the whole mitochondrial genomes of veneridae species used in the present study as well as other representative species for further studies.

2.7 Acknowledgements

We are grateful to Dr Richard St-Louis from ISMER, Dr Edouard Kraffe, and Diane Bérubé for help in the development of the lipid analysis method. Daniel Munro is supported by a scholarship grants from NSERC and the FONCER programme from Réseau Aquaculture Québec. This project was supported by an NSERC Discovery grant to Pierre Blier.

CHAPITRE III

AGE, DIET AND SEASON DO NOT AFFECT LONGEVITY RELATED DIFFERENCES IN PEROXIDATION INDEX BETWEEN *S. SOLIDISSIMA* AND *A. ISLANDICA*

Daniel Munro and Pierre U. Blier

Laboratoire de biologie intégrative, Département de Biologie, Université du Québec à Rimouski, 300 Allée des Ursulines, Rimouski, Québec, Canada G5L 3A1; (Daniel Munro: conception du projet, expérimentation et analyse des données, rédaction de l'article et conception des figures; Pierre U. Blier : aide à la conception du projet, supervision et aide à la rédaction de l'article.

Sous presses 2014 dans *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* (2014): glu054. Les références citées dans l'article sont reportées à la fin de la thèse.

3.1 Résumé

La susceptibilité à la peroxydation lipidique des membranes biologiques (indice de peroxydation, IP) augmente avec le nombre de doubles liaisons des acides gras (AG) et est inversement corrélée à la longévité des espèces chez les mammifères, les oiseaux et les mollusques bivalves. Toutefois, chez les mollusques, la composition en AGPI pourrait être modifiée par la température, la diète et l'âge des individus. Nous avons vérifié comment ces paramètres peuvent influencer la corrélation entre l'IP et la longévité chez les bivalves. Nous avons déterminé (CPG-SM) la composition en AG et en diméthyl acétals (DMA) des phospholipides de branchies mitochondriales et non mitochondriales chez la Mye commune (*Mya arenaria*, LMR = 28 ans) et le Quahog nordique (*Arctica islandica*, LMR = 507 ans) exposés à différents traitements de température (saisons) et diète (abondance de microalgues). Nous avons aussi vérifié l'effet de l'âge individuel chez des Mactres Atlantiques (*S. solidissima*) variant entre 6 et 23 ans. L'augmentation en température de l'hiver à l'été (2 à 12 °C) a diminué la proportion d'AEP, l'IP et les DMA dans les mitochondries des deux espèces. La supplémentation en microalgues a augmenté les AGPI et l'IP et a fait diminuer la proportion de DMA. L'âge des individus n'a pas influencé l'IP des *S. solidissima*. La découverte principale de cette étude est que l'IP d'*A. islandica* reste significativement plus faible que celui de *S. solidissima* pour de mêmes conditions de température et nutrition. Les différences d'IP associées à la longévité apparaissent résilientes aux influences additionnelles qui agissent sur la composition lipidique des membranes de bivalves.

3.2 Abstract

The susceptibility to peroxidation (peroxidation index, PI) of membrane lipids increases with the double bond content of fatty acids (FA) and is inversely correlated to longevity in mammals, birds and bivalve molluscs. However, in molluscs, membrane PUFA content can also be affected by temperature, nutrition and individual age. Here we evaluate how these parameters may alter the correlations between PI and longevity. We determined the gill mitochondrial and non-mitochondrial phospholipids' FA and dimethyl acetal (DMA) composition (GC-MS) in the short-lived *S. solidissima* (max. long. = 37 y) and the long-lived *A. islandica* (max. long. = 507 y) exposed to different microalgae diet abundance and temperature (season) treatments. We also evaluated the effect of individual age on PI in *S. solidissima* (from 6 to 23 y). The temperature increase from winter to summer (2 to 12 °C) decreased the proportion of eicosapentaenoic acid, the PI and the DMA in mitochondria. Food supplementation increased PUFA and PI, and decreased DMA. Age did not affect the PI in *S. solidissima*. The main finding of this study is that the PI of *A. islandica* remained significantly lower than that of *S. solidissima* in

corresponding fractions throughout treatments. Longevity-related difference in PI therefore appears resilient.

3.3 Introduction

Upon attack by ROS, polyunsaturated fatty acid (PUFA) esterified to membrane phospholipids (PL) can undergo a chain reaction of autoxidation followed by the release of reactive aldehydes. These toxic by-products of lipid oxidation are acting as secondary ROS forming adducts to protein, lipids and DNA (advanced lipoxidation end products) causing a loss of functionality or mutation that are viewed as contributing to cellular aging (Pamplona 2008). The susceptibility to autoxidation of FA increases with increasing number of double bonds on the carbon chain (Holman 1954). FA class specific index of susceptibility to oxidation can be used to calculate a membrane peroxidation index (PI) after performing PL FA analysis of tissues. Such membrane PI value has been found to negatively correlate with species longevity for liver mitochondria PL as well as for PL of whole skeletal muscle tissue among a number of (mostly endotherms) vertebrates (reviewed in Hulbert et al. 2007; Pamplona & Barja 2011; Valencak & Ruf 2007). Membrane PI also associates negatively with longevity within species of invertebrates among individuals of different strains or class (Haddad et al. 2007; Reis et al. 2011). Using the longest-lived metazoan, the mud clam *Arctica islandica* (longevity max = 507 y; Ridgway & Richardson 2011), and four related bivalves species of shorter longevity, we recently evidenced such a negative correlation between gill membrane PI and longevity (Munro & Blier 2012).

The aim of the present contribution is to assess the influence that diet and temperature can have on the magnitude of the PI differences found among bivalves species of different longevity. Whilst these factors are not (or marginally) at play in vertebrates homeotherms, they are known to affect membrane lipid composition in marine bivalves. The diet of filter-feeding clams is very rich in HUFA, and as a possible

evolutionary consequence they have lost the enzymatic pathway for their *de novo* synthesis. HUFA composition is very variable among phytoplankton species, variations in phytoplankton species availability among bivalve populations may be reflected in membrane composition. More importantly, dietary deficiencies or restriction in individuals cultured for experimental purposes may produce drastic changes in membrane HUFA composition and associated PI. Long-lived species of bivalves may manage these variations in a different manner than short-lived one e.g. long-lived species may be directing less dietary HUFA toward membrane PL and thus be more resilient to the effects of variations in diet abundance/composition on membrane PI.

Body temperature is known to largely influence membrane FA composition in ectotherms. Cold increases membrane lipid packing order, which decreases membrane fluidity. This results in a decrease in integral membrane protein activity and ion permeability that together decreases the pace of biological process. In response to a decrease in temperature, many cold active (as opposed to cold dormant) ectotherms undergo lipid remodelling that would counteract these effects. This either includes increasing the ratio of unsaturated to saturated FA (homeoviscous adaptation, HVA), or increasing membrane HUFA, reviewed in (Hazel & Williams 1990; Moyes & Ballantyne 2011). Whilst the first type of response does not necessarily involve a modification of the membrane PI, the second should increase it importantly with decreasing temperature. Again, long-lived bivalves species may respond differently from short-lived ones to changes in temperature e.g. slow growing long-lived species may not need to preserve the same level of enzymatic activity during cold exposure as whole organism metabolism is generally maintained relatively lower (Ridgway, Richardson & Austad 2011). This would create variations in the magnitude of the difference in PI found between long-lived and short-lived species as a function of temperature.

Interestingly, bivalves are capable of synthesizing non-methylene interrupted fatty acids (NMI), mostly 20:2 and 22:2 FA with four or six methyl group between double bonds that are preferentially incorporated into membrane phospholipids (Barnathan 2009). NMI have been reported to possess even better fluidizing effect on membrane than HUFA (Zakhartsev et al. 1998), and would be recruited to compensate HUFA dietary deficiencies as well as to maintain fluidity in response to declining temperature (Barnathan 2009). As, NMI FA are characterized by a much lower specific PI (Kaneniwa et al. 1988), and can be found in important proportions in bivalves, up to 18.8% in *A. islandica* (Munro & Blier 2012), a change in their proportion within membrane is likely to result in important modification of the PI.

Plasmalogens (1-alkenyl-2-acyl-sn-glycero-3-phospholipids) are also an abundant type of lipid in bivalves (Munro & Blier 2012; Kraffe et al. 2004). These PL have a more conical structure than regular PL which increases the lateral pressure inside membrane, and the resulting influence is complex. They lower the temperature threshold for the transition between the gel phase to the hexagonal phase, they increase membrane viscosity within the temperature limits of the fluid phase, and they generally decrease ion permeability (reviewed in Hazel & Williams 1990). Previous studies have found a positive association between temperature and plasmalogen content of membranes (Hazel & Williams 1990; Kakela et al. 2008). Further, the plasmalogen-specific vinyl ether bond is known to act as a ROS scavenger and breaker of autoxidation, and it is believed to confer *in situ* antioxidant protection in membranes (Yavin et al. 2002; Engelmann 2004; Kuczynski & Reo 2006). Changing plasmalogen content within membrane is a mean of modulating resistance to lipoxidation that would not be integrated by simply calculating PI. Changes in plasmalogen content must therefore be appreciated in parallel to the change in PI as to properly evaluate membrane susceptibility to oxidation.

Branched chains (comprising iso and anteiso FA and DMA) are also important components of bivalve membranes (up to 15 % in mitochondria of *Mercenaria mercenaria*). The branching of a chain increases disorder among membrane FA and decreases the gel to fluid transition temperature, but it also increases viscosity of the fluid phase (Hazel & Williams 1990). Proportions of branched carbon chains also change as a function of temperature, and they must be included in the lipid analysis and subsequent calculation of the PI.

Moreover, the effect of age on membrane FA composition and PI has never been investigated in bivalves. In rodents, PI has been shown to either increase or remain constant with individual age (Hulbert et al. 2007; Hulbert, Faulks, et al. 2006). In invertebrates and fish, PUFA either increases or decreases with age (Hulbert et al. 2007; Haddad et al. 2007; Lucas-Sánchez et al. 2011; Correia et al. 2003; Barata et al. 2005; Mourente & Diaz-Salvago 1999). Bivalves tissues are non-postmitotics and the organism's growth follows a von Bertalanffy function i.e. growth is very rapid in the first years until it reaches an inflexion point after which it is asymptotic and never ceases. In *A. islandica*, previous studies have shown that physiological traits such as antioxidant defences can change during rapid growth, but remain stable throughout the asymptotic period (Abele et al. 2008). As this period is indefinite and seems not subdivided by any changes in hormones, behaviour, reproductive involvement or other aspects of biological program, many physiological traits such as PI may well remain stable. Investigating this potentially confounding factor is important for valid interspecific PI comparisons be made using bivalves.

Using the short-lived *Spisula solidissima* and the long-lived *A. islandica*, we investigated the influence of macroalgae diet quantity and season (water temperature) on membrane PI differences. The existence of an age-PI relationship was further investigated for *S. solidissima*. Because we previously found a different PI-longevity

relationship for mitochondria compared to other cell membranes, all lipid analysis were performed in parallel for these two types of biological membranes.

3.4 Method

3.4.1 Animal care and schedule of dissection

A first lot of *Spisula solidissima* and *Arctica islandica* were collected during spring 2009 in the Magdalene Islands, Qc (Canada) at the following location and depth: *S.s.*, 47°32'N 61°37'W at 5 m; *A.i.* 47° 21'N 61°45'W at 15 m, and air-shipped to the Station Aquicole in Pointe-Au-Père, Qc, Canada. Upon arrival at the station, they were numbered and placed in an open flow-through, two-tank system containing 20 cm of sand. In addition to the natural phytoplankton remaining in the semi-filtred (50 µm) water of the station, bivalves were fed a mixed suspension of live microalgae (*Nannochloropsis* sp. 12%, *Isochrysis galbana* 44%, and *Pavlova lutheri* 44% in cell number) purchased at NutrOcéan Inc (Qc, Canada). This supplementation was adjusted to reproduce the natural cycle of microalgae abundance i.e. it was given at 1% body mass/d at 8°C, and adjusted following temperature changes between April and November according to a Q₁₀ of 2.5. A first group was dissected in April following the mild starvation of the winter that corresponds to the period of very low food abundance in the natural environment; this group is referred to as the natural cycle group in regard of the effect of food abundance. At this period of the year, water temperature had been at its minimum of 2 °C for four months which should have allowed full extent of cold lipid remodelling. Hence, individuals collected at that period are referred to as the winter group in regard of temperature effect. A second group (summer group) was dissected in late August when water temperature had stabilized at its highest value of 12 °C for one month, allowing full extent of warm lipid remodelling. Hence the effect of season was assessed with the provisioning of food that followed the natural cycle. A second lot of *S. solidissima* was collected in

April 2010 at the same location in Magdalene Islands. A second lot of *A. islandica* was collected by Gulf of Maine Inc on the coast of Maine (USA) in early March 2010. These new clams were kept in identical conditions, with the exception that they were provided with the microalgae diet earlier in spring and at full rate of feeding (corresponding to 8 °C for the natural cycle group) even though water temperature was still between 2 and 6 °C. These were subsequently sampled in late May and are referred to as the early spring supplemented group in regard of the effect of food abundance. Hence the effect of food abundance was estimated at low temperature when metabolic requirements are still low which ascertained that additional FA provisioning is available for incorporation into membranes and not used for investment into reproduction or fuelling of a warm temperature associated-high metabolism. Individuals of *S. solidissima* of all groups were of similar size distribution. For those of the spring supplementation, shells were cut and age was read to test for a possible relationship between age and membrane FA composition. Individuals of *A. islandica* used in this study were not aged directly. However, accurate age determination for 16 individuals from the same collection expedition were between 50 and >100 years old which is well past the size of maturity and within the period of asymptotic growth according to fishery management reports (Roddick, Kilada, et al. 2007). Visual inspection of the individuals used in this study suggest similar age distribution according to sizes, shape, coloration and wear of the black cuticle.

3.4.2 Biological fractions isolation

Mitochondria were isolated as described in (Munro & Blier 2012). Briefly, gills were removed, minced and homogenization was performed using a Potter-Elvehjem. The homogenate was centrifuged at 1 250 g for 10 min and the supernatant was removed and conserved. The pellet was resuspended in 15 mL of homogenization buffer and centrifuged at 1 000 g for 10 min; this second supernatant was removed and pooled with the first one. The final pellet of cellular debris was conserved; this represented

the biological fraction containing non-mitochondrial membranes. The two supernatants were then combined and a first centrifugation was run at 1 250 g for 10 min to eliminate residual debris. The final supernatant was centrifuged at 10 500 g for 15 min to recover the final mitochondrial pellet. All homogenization and centrifugation steps were carried out at 4°C. Both biological fractions were held at -80°C under nitrogen until lipid extraction. The non-mitochondrial fraction was assayed for mitochondrial specific enzyme and was found essentially devoid of mitochondria (Munro & Blier 2012).

3.4.3 Lipid analysis

Lipids were analyzed as described in (Munro & Blier 2012). Briefly, polar lipids of the mitochondrial and non-mitochondrial fractions were separated on silica gel (60, mesh 150–230) microcolumns. The total phospholipids acyl and alkenyl chains were then transmethylated in Boron trifluoride-methanol (SUPELCO, Bellefonte, PA) and the resulting fatty acid methyl esters (FAME) and dimethyl acetals (DMA) were analysed with GC-MS (GC: AGILENT 6850 series II; MS: AGILENT 5975 B), using a high polarity column (HP-88 60 m, 0.25 mm × 0.20 µm). Calibration of the system was performed using regular FA mix standards (SUPELCO 37 FAME), marine FA standards (SUPELCO, Bellefonte, PA), and DMA standards (SIGMA-Aldrich). Since triglycerids were eliminated from the analysis and only phospholipids were subjected to methylation, the percentage of plasmalogens among phospholipids is simply double the percentage of DMA among the total of carbon chains. The chain fluidity index (CFI) is calculated according to equation [3.1] where chains refers to both FA and DMA.

$$CFI = (1 * \text{monounsaturated chains}) + (1.5 * \text{polyunsaturated FA}) \quad (3.1)$$

This equation aims at representing the relative contribution of monounsaturated and polyunsaturated FA or DMA to the overall membrane fluidity according to Coolbear (Coolbear et al. 1983).

3.4.4 Age determination

The bivalve *S. solidissima* is characterized by a large chondrophore located adjacent to the hinge that presents interannual growth lines visible to the naked eye at least for the first 10 years of growth (Jacobson et al. 2006). Hence, age can be estimated by the sole use of a magnifying glass or laboratory binocular. To ascertain of the validity of this method, individual ages have previously been determined in 16 of our individuals with a classical method under the supervision of a bivalve sclerochronology specialist (Dr Julien Thébault, UBO, France). Briefly, a 1.6 mm thick section of the left valve of shells was cut perpendicularly to the growth lines in the chondrophore section using a low speed precision saw (Struers secotom-10) equipped with a diamond coated blade. The section was mounted on glass slide, manually ground sequentially with decreasing grade sand paper and polished with 3 μm Al_2O_3 powder. Interannual growth lines were resolved by taking high resolution photographs (20x) using a Zeiss (AxioCam MRc5) camera attached to a Zeiss (LumarV12) microscope. The right valve of the same individuals was then read with laboratory binocular to establish the correspondence. The binocular method cannot allow visualizing the first interannual growth line, but the subsequent lines are easily resolved. Therefore, we aged the individuals of this study with the binocular method and added one year to account for the previously determined bias.

3.4.5 Statistics

The factors age, wet weight and length were included in ANCOVA as covariates to test for a possible correlation with PI, EPA, DHA and DMA contents in parallel for both biological fractions. When no interaction between the biological fraction (mitochondria or non-mitochondrial) was found, the interaction term was eliminated to test the effect of the covariates alone. The effects of microalgae supplementation (Supp) and season were tested in a three-way ANOVA including the factors species and biological fraction (mitochondrial or non-mitochondrial membrane), and all their

interactions. Significant differences among groups ($\alpha = 0.05$; Tukey's HSD post hoc) are presented in figures for significant interactions or factors. Homogeneity of the variance was ascertained by visual examination of the residuals. All analysis was performed using the JMP v10.0 statistical package (SAS Institute Inc.). Results are presented as means \pm SEM in figure 3.2 and 3.3. A table listing F -ratio, df and P -value for the ANCOVA and ANOVA that preceded Tukey-Kramer HSD is available in the annexe C (Table C1).

3.5 Results

Individuals of *S. solidissima* of the sampled population are reported to be mature at length between 75 and 92 mm (Giguère et al. 2005). All individuals used in this study were over a length of 100 mm, and should hence be sexually mature. However, the range of ages (from 6 to 23 y) encompasses a very important part of the total asymptotic growth period (from 5 and 37 y), which ascertains that any effect of age during this period should be detected. Furthermore, a suspension of microalgae rich in HUFA was provided for one month during early spring before dissection as to allow expression of age-specific membrane FA composition not precluded by dietary restriction. We found no relationship between age and HUFA i.e. there was no relation with levels of total pentaene FA (five double bonds, mostly EPA; $F_{1,35} = 0.005$; $P = 0.941$), DHA ($F_{1,35} = 1.02$; $P = 0.320$) (data not shown). Levels of NMI were neither related to age ($F_{1,35} = 0.016$; $P = 0.901$) (data not shown). In accordance, no relationship was found between age and PI (Fig. 3.1 A).

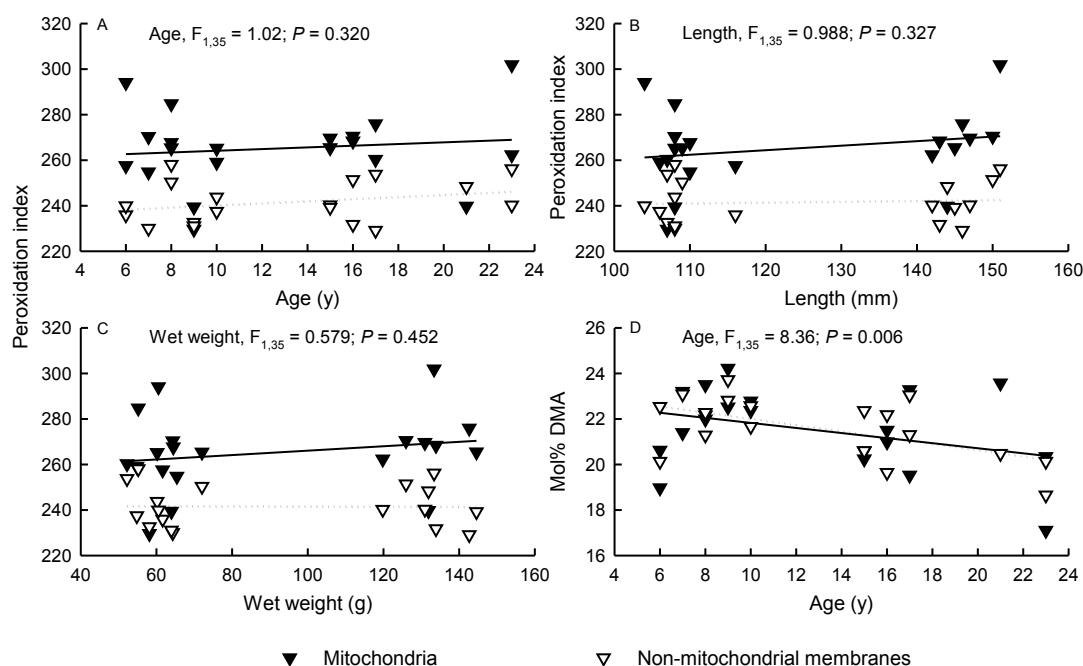


Figure 3.1 Relationship between age (A), length (B) and wet weight (C), and the peroxidation index (PI) of gill membranes in *S. solidissima*. D, relationship between age and the percent of dimethyl acetal (DMA) among all carbon chains (FA + DMA). The solid and dotted lines are for the relationship with the mitochondrial and non-mitochondrial fraction respectively. No interaction between the biological fraction and the covariates (age, length or wet weight) were found in all cases (ANCOVA, Table C1)

However, sizes are surprisingly variable for similar age in bivalves. As there is a known relationship between body size and membrane FA composition in mammals (Hulbert, Rana, et al. 2002) we further attempted to correlate the PI to length and wet weight. Neither of these covariates correlated with PI (Fig 3.1 B, C). Interestingly however, levels of DMA decreased with age for both biological fractions (Fig. 3.1 D). Table C1 provides detailed results for the test of the interaction between biological fraction and the covariate (age, length or wet weight) which were non-significant in all cases.

Since age had no effect on HUFA and PI, the 20 *S. solidissima* were pooled (early spring supplemented group, Spring supp) and compared with individuals of similar size distribution, also sampled during spring, but for which feeding had not yet resumed after the mild winter starvation (natural cycle group). Furthermore, individuals of *A. islandica* had also been maintained in the same two sequences of natural feeding cycle or early spring supplementation which offers the possibility to compare the effect of supplementation in parallel for a short-lived (fast growth rate) and a long-lived (slow growth rate) species (Ridgway, Richardson & Austad 2011). Spring supplementation increased the proportion of HUFA incorporated into membranes. Pentaenes FA significantly increased in *S. solidissima* without differences between fractions (Supp*fraction, $F_{1,7} = 1.046$; $P = 0.310$). No increase for this class of FA was however seen for *A. islandica* (Fig. 3.2 A).

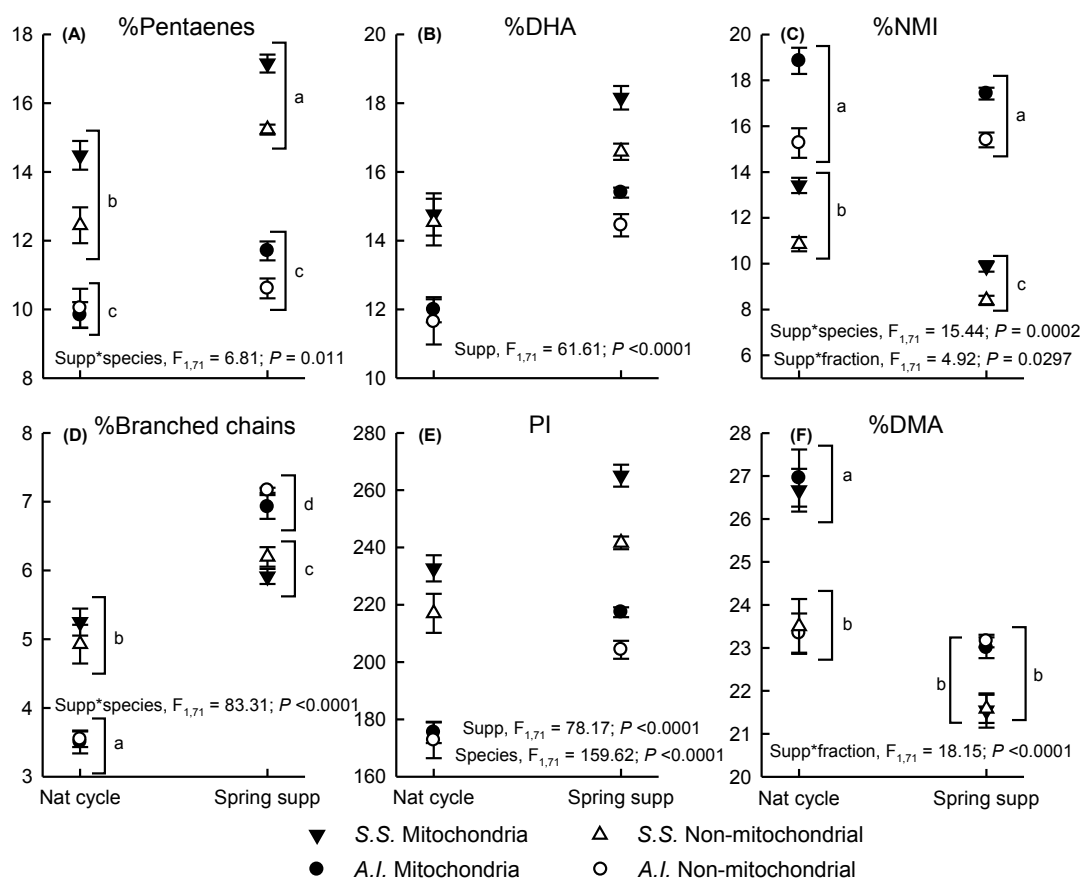


Figure 3.2 Effects of normal mild winter starvation followed or not by early spring supplementation of microalgae on markers membrane lipid composition in gills of *S. solidissima* and *A. islandica*. Pentaenes: fatty acids of five double bonds, DHA: docosahexaenoic acid, NMI: non-methylene interrupted fatty acids, DMA: dimethyl acetals. Different letters are for significant differences (three ways ANOVA). Results are mean \pm SEM.

Docosahexaenoic acid increased for both fractions in both species as confirmed by non-significant interaction terms (Supp*species, $F_{1,71} = 0.271$, $P = 0.604$; Supp*fraction, $F_{1,71} = 1.714$, $P = 0.195$; Fig. 3.2 B). In contrast, NMI FA was lower in the spring supp groups. Among species, the decrease was more pronounced for *S. solidissima*; among fraction it was more pronounced for the mitochondrial

membranes (Fig. 3.2 C). Branched chains (iso and anteiso FA + DMA) were increased in both species by supplementation. This effect was similar for both fractions (Supp*fraction, $F_{1,71} = 2.094$, $P = 0.152$), and more pronounced for *A. islandica* (Fig. 3.2 D). This difference between species was due to a large increase in branched DMA only observed in *A. islandica* (Supp*species, $F_{1,71} = 103.24$, $P < 0.0001$; data not shown).

Overall, mostly as a result of the substitution of dienes NMI for HUFA, supplementation increased the PI. However, no significant interaction terms were found (Table C1), and hence, this increase was uniform among the two species and fractions. As a result, the differences in PI between the two species are maintained for both food groups (Fig. 3.2 E). Food supplementation further produced the unexpected effect of decreasing DMA (plasmalogens) in mitochondria of both species (Fig. 3.2 F).

Clams of the natural cycle group were sampled again in late summer (late August) when water temperature has been at its highest annual point (12 °C) for two weeks. This allowed testing the effect of season (mostly the effect of temperature) on membrane lipid composition by comparing with the individual sampled after winter acclimation, during early spring at 2 °C. We found no effect of season on the abundance of branched carbon chains (data not shown). However, in accordance with expectations of a cold induced lipid remodelling, the levels of pentaenes decreased from winter to summer (Fig. 3.3 A).

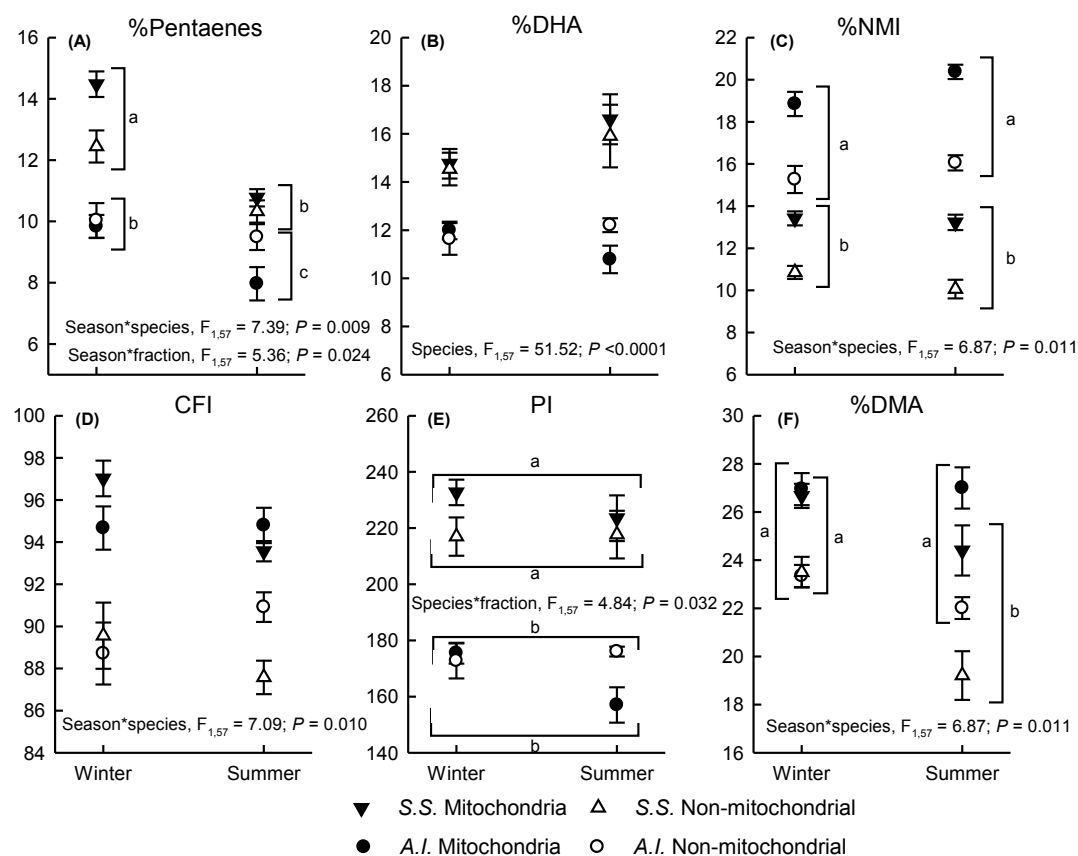


Figure 3.3 Cold induced lipid remodelling in gills of *S. solidissima* and *A. islandica*. Individuals were sampled during winter (early April) and summer (late August) when water temperatures had been stable at 2 °C for 4 months and at 12 °C for two weeks respectively. Abbreviations are as in Fig. 2. Chain fluidity index (CFI) is calculated as : $CFI = (1 \times \text{monounsaturated FA or DMA}) + (1.5 \times \text{polyunsaturated FA})$.

Different letters are for significant differences (three ways ANOVA). Results are mean \pm SEM.

In contrast, the effect of season on DHA tended to be in opposite direction between species (Season*species, $F_{1,57} = 3.31$, $P = 0.074$; Fig. 3.3 B). Interestingly, NMI did change in opposite direction between species, and the direction of the change in each species was opposite to the trend observed for DHA (Fig. 3.3 C). We calculated the

chain fluidity index (CFI) that reflects the contribution of carbon chain unsaturation on the resulting fluidity of the membrane. The response of *S. solidissima* was in accordance with HVA with a decrease from winter to summer, however, no changes occurred for *A. islandica* (Fig. 3.3 D). Overall, the temperature induced-lipid remodelling caused a trend for a decrease in PI from winter to summer in the mitochondrial fractions but not in the non-mitochondrial fraction (Season*fraction, $F_{1,57} = 3.38$, $P = 0.071$; Fig. 3.3 E). As the changes were similar for both species, the significant differences in PI between them were maintained from winter to summer; the absolute difference was even slightly increased in the case of mitochondria. Furthermore, the overall abundance of DMA significantly decreased from winter to summer in *S. solidissima*, but not in *A. islandica* (Fig 3.3 F).

3.6 Discussion

The aim of this study was to verify how microalgae abundance, season and individual age would influence bivalves PI. In particular, we used the short-lived *S. solidissima* and the long-lived *A. islandica*, to test if diet abundance and/or season would modify the amplitude of the longevity related difference in PI separating them (Munro & Blier 2012). Interestingly, we found that both diet abundance and season proved capable of modifying the PI value to some extent, however, the magnitude of the change was similar for both species which resulted in the maintenance of the same relative difference in PI within each condition. Membrane PI in mammalian species is under homeostatic control that maintain constant values throughout a range of medium to high manipulation of dietary PUFA (Hulbert et al. 2014). This is made possible in part because of the capacity to synthesize long-chain n-6 and n-3 PUFA from their precursors (linoleic acid, 18:2n-6; and linolenic acid, 18:3n-3). Long-chain PUFA are highly abundant in marine phytoplankton, and possibly as a result, many filter feeding species do not have the capacity for their *de novo* synthesis.

Furthermore, mammalian species can also exchange FA between triacylglycerol reserves and membrane phospholipids through the action of the acyl transferase (Lands et al. 1982). Lipid reserves are however less important in bivalves (Bricelj et al. 2006) which may impose a proximal limit in resorting to this mechanism for the control of the membrane PI in the face of dietary deficiencies. Here we found that high microalgae diet abundance resulted in elevated HUFA content in membrane, mostly DHA, and a resulting high PI value in both biological fractions investigated (mitochondria and non-mitochondrial membranes). However, no significant interaction was found between the treatment and the species, which maintained the same amplitude of differences in PI between *S. solidissima* and *A. islandica* across diet abundance treatments.

Season was also expected to affect membrane lipid composition of our bivalves species mainly through a cold induced lipid remodeling (Hazel & Williams 1990; Parent et al. 2008; Pernet et al. 2007; Pernet et al. 2006). However, lipid remodeling is not necessarily bound to modify the PI since actual HVA mostly requires a change in the ratio of saturated to unsaturated FA and not in the proportion of PUFA and much less HUFA (Coolbear et al. 1983). However, many ectotherms respond to cold by increasing the levels of HUFA (Hall et al. 2002; Parent et al. 2008; Pernet et al. 2007) which may pertain to the maintenance of integral enzyme activity through adjustments of direct lipid-protein interactions involving key HUFA such as EPA and DHA (Contreras et al. 2011). This second type of response is of course highly susceptible to increase the PI. Here we found that the HVA response to cold (measured by the *CFI*) was solely expressed by *S. solidissima* while the increase in HUFA was observed in both species. Interestingly, the outcome of these changes was limited to a trend for a higher mitochondrial PI during winter that was similar in magnitude for both species. Hence, despite that the cold induced lipid remodeling is species specific, the amplitude of the longevity related difference in PI between *S. solidissima* and *A. islandica* is maintained across seasons.

In contrast to diet abundance and season, individual age does not seem to affect the PI of mature bivalves. Testing this possibility was important in view of the wide diversity of results in other taxa. In rats, PI is generally reported to increase with age in liver and heart, but some studies found no changes in these organs and a decrease is reported for the brain synaptosomes and cerebral cortex (reviewed in Hulbert et al. 2007). In the exceptionally long-lived naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*), age had no effects for muscle, heart, kidney, liver and brain, and the authors conclude that PI is a rather species-specific trait (Hulbert, Faulks, et al. 2006). In killifish *Nothobranchius korthausae*, whole body PI for all lipid class increases slightly from the age of 2 weeks to 20 weeks and then declines sharply in senescent individuals (Lucas-Sánchez et al. 2011). In flies, membrane PI increased with age in drosophila (Hulbert et al. 2007), but not in honeybee queens and workers (head + thorax + abdomen; Haddad et al. 2007). In aquatic invertebrates, whilst PUFA in all class of lipids of the whole body increase with age in *Daphnia magna* (Barata et al. 2005; Bychek & Gushchina 1999), they decrease in *Gammarus locusta* (Correia et al. 2003) as well as in total lipids of the brain in shrimp *Aristeus antennatus* (Mourente & Diaz-Salvago 1999).

We found that, PUFA, HUFA or the PI value did not change among 20 mature *S. solidissima* ranging between 6 and 23 years for a species with a MRL of 37 y. We cannot exclude the possibility that PI may change before maturity; indeed, antioxidant defences have been shown to change during this period in *A. islandica* and stabilize thereafter (Abele et al. 2008). However, we provide first evidence that it does not change during the phase of slow asymptotic shell growth which may be the relevant period on a gerontological point of view. In bivalves growth never ceases, it rather follows a Von Bertalanffy growth function where the phase of slow asymptotic growth can represent a large proportion of individual life. In the short lived *S. solidissima*, growth is rapid until age of 6 to 10 years, depending on the population (Jacobson et al. 2006; Sephton & Bryan 1990), and MRL is 37 years. In *A. islandica*,

growth is rapid for the first 20 to 30 years, depending on the population (Strahl et al. 2007; Roddick, Kilada, et al. 2007), and MRL is 507 years. Hence, individuals establishing maximal longevity records in these species spent between 73 to 94%, of their life within the phase of slow asymptotic growth. It is therefore during this period that the physiological modulators of longevity should primarily be acting. Here we show that the PI does not change during this part of the life in *S. solidissima* and may thus represent species specific trait explaining differences in maximal longevity.

Bivalves have been suggested to respond to cold (Zakhartsev et al. 1998; Barnathan 2009) or mitigate HUFA deficiencies (Barnathan 2009) through *de novo* synthesis (Zhukova 1991) of NMI which can affect membrane PI given their very low class specific PI (Kaneniwa et al. 1988). By manipulating the diet abundance, we confirmed the inverse relationship between NMI and HUFA content in bivalve membranes. However, NMI were not recruited in response to cold during winter which contrast with results from (Pernet et al. 2006), but is in accordance with (Pernet et al. 2007). Interestingly, again, the substitution of HUFA for NMI was part of a set of changes that preserved the difference in PI between species.

Plasmalogens are not included in the calculation of the PI which solely integrates information on the number of double bonds. However, given their antioxidant potential, they should influence the rate of membrane lipoxidation (Engelmann 2004; Kuczynski & Reo 2006) and should be appreciated in parallel to the PI. Their abundance can be accurately estimated by the abundance of DMA whenever the lipid analysis excludes triglycerides (Bueno et al. 2012). When estimated by this mean, we found that they represent 53-55 % of phospholipids in mitochondria of *A. islandica* and *S. solidissima* (Fig 3.2 F and 3.3 F). Hence, their protective effect may be particularly important in bivalves tissues compared to the human brain where they do not exceed 20 % (Farooqui & Horrocks 2001). Supplementation of microalgae decreased the level of plasmalogens in the mitochondrial fraction of both species.

Lower levels of these phospholipids were also found for *S. solidissima* during summer. The functional significance of these changes in regard of cold induced lipid remodeling and diet abundance is beyond the scope of this contribution given their complex effect on the membrane physical properties (Hazel & Williams 1990). Nonetheless, we found a decreasing abundance of plasmalogens with increasing individual age in both biological fractions of *S. solidissima*. These results are in line with the finding that serum plasmalogens levels markedly decrease between young and elderly human subjects (Maeba et al. 2007). Why would plasmalogen decrease with age during asymptotic growth in bivalves is a difficult question. An increase in the rate of mitochondrial ROS production with age, as often expected under the “oxidative stress theory of aging”, should increase their rate of oxidation. Using *M. arenaria* (Philipp et al. 2005) found no increase with age in H₂O₂ efflux of mantle mitochondria, but normalization with oxygen consumption (free radical leak) revealed an increase. Nonetheless, according to (Engelmann 2004), plasmalogens are replenished at a sufficient rate to be considered functional antioxidants. Elevated rates of ROS production, within physiological limits, should thus only results in an increase turnover rate of plasmalogen in membranes and not in a net lower proportion. Here we observed a decrease in plasmalogens content with age without compensating changes in PI, our results thus suggest that the susceptibility to lipoxidation of gill membranes should increase as part of the aging process in *S. solidissima*.

In conclusion, the PI value is a much more variable trait in bivalves than in mammals were body temperature is kept constant and additional mechanisms such as the *de novo* synthesis of PUFA, and the exchange of FA between phospholipids and triacylglycerol render possible a strict homeostatic control. Nonetheless, the present findings suggest that, throughout the period of slow asymptotic growth, the longevity related-relative differences in PI among bivalve species may very well be maintained, at least for individuals inhabiting the same environment.

3.7 Acknowledgements

We are grateful to Dr Edouard Kraffe and Philippe Soudant for help in the development of the lipid analysis method as well as Dr Julien Thébault for help in age reading of *S. solidissima* individuals.

CHAPITRE IV

COLD-INDUCED MEMBRANE LIPID REMODELLING IS NOT EXPRESSED DURING QUIESCENCE IN THE BIVALVE *MERCENARIA MERCENARIA*

Daniel Munro¹, André Martel² and Pierre U. Blier¹

¹Laboratoire de biologie intégrative, Département de Biologie, Université du Québec à Rimouski, 300 Allée des Ursulines, Rimouski, Québec, Canada G5L 3A1; (Daniel Munro: conception du projet, expérimentation et analyse des données, rédaction de l'article et conception des figures; Pierre U. Blier : aide à la conception du projet, supervision et aide à la rédaction de l'article.

²Section zoologie (malacologie), Musée canadien de la nature, C.P. 3443, Succ. D, Ottawa (Ontario) Canada K1P 6P4 (André Martel : aide à la réalisation du projet, supervision).

Soumis en Août 2014 dans *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.
Les références citées dans l'article sont reportées à la fin de la thèse.

4.1 Résumé

Le froid augmente la viscosité des membranes biologiques et diminue l'activité des enzymes transmembranaires. En réponse, les ectothermes opèrent un remodelage des lipides membranaires pouvant inclure une diminution de la proportion des AGS ou une augmentation de la proportion des AGHI. En région tempérée, cette réponse est nettement plus présente chez les espèces qui restent actives durant la saison froide que chez celles qui entrent en dormance pour toute la saison hivernale. Le Quahog du Nord (*Mercenaria mercenaria*) est une espèce de bivalve qui n'entre en dormance à l'hiver (quiescence) que de façon facultative lorsque la température de l'eau diminue sous le seuil de 6-7°C. Les valves sont alors maintenues fermées, l'activité de filtration cesse et les individus montrent des signes de stress physiologique. Il a été montré que l'espèce augmente la teneur en AGHI de ses membranes lorsque la température descend de 23 à 0 °C, mais la presque totalité du changement s'effectue entre 23 et 8°C, soit aux températures où l'espèce reste active. Nous avons conçu cette étude pour tester si un changement dans la proportion des AG membranaires pouvait avoir lieu lorsque la température de l'eau ne descend que dans l'intervalle où les individus sont en état de quiescence i.e. si les Quahogs nordiques sont capables d'opérer un remodelage des AG lorsqu'ils sont en état de quiescence. Des individus ont été élevés en parallèle avec ceux de deux espèces sympatriques et évolutivement associées (vénéroïdes) mais tolérantes au froid (*Spisula solidissima* et *Arctica islandica*). Les individus ont été récoltés durant l'été et exposés à des températures fluctuant entre 12 et 2°C au cours de l'année. Afin de mesurer l'acclimatation finale à chacune des saisons, ils ont été échantillonnés à la fin de l'automne (*M. mercenaria*), à la fin de l'hiver (les trois espèces) et à la fin de l'été (les trois espèces). La composition en chaînes carbonées (AG + DMA) des PL membranaires de branchies a été analysée par CPG-SM/FID à la fois dans les mitochondries et dans les membranes non mitochondriales pour les trois espèces à l'hiver et à l'été. Pour *M. mercenaria*, deux marqueurs de peroxydation lipidique, TBARS et LOOH, ont été mesurés, respectivement, dans les homogénats et dans les membranes non-mitochondriales de branchies aux trois points d'échantillonnage. Un suivi de l'ouverture des valves a été fait chez les trois espèces du début de l'automne à l'été suivant. La fermeture des valves sous le seuil de 6-7°C n'a été notée que chez *M. mercenaria*. Les niveaux des marqueurs de peroxydation lipidique étaient à leur plus élevé à l'automne pour redescendre durant l'hiver et descendre encore à l'été. Les changements d'AG chez cette espèce étaient contradictoires aux attentes pour un ectotherme actif durant l'hiver; l'indice de fluidité membranaire (CFI) et la teneur en AGHI étaient à leur plus bas à la fin de l'hiver lorsque l'acclimatation aurait dû être complète. Au contraire, dans les membranes mitochondriales des deux autres espèces, le remodelage lipidique conséquent au froid est survenu de la façon attendue pour des ectothermes actifs. À l'hiver, le CFI et la teneur en AGHI étaient respectivement plus élevés pour *S. solidissima* et *A. islandica*. Nos résultats suggèrent que le remodelage lipidique induit par le froid n'est pas une réponse maintenue par *M. mercenaria* après

l'entrée en quiescence. Une coordination fine entre le remodelage lipidique membranaire et l'état d'activité d'une espèce ectotherme serait bénéfique en permettant de ralentir le métabolisme cellulaire et donc la dépense énergétique en périodes de quiescence.

4.2 Abstract

To counteract the effects of cold on the pace of membrane bound metabolic processes, winter active ectotherms decrease saturated fatty acids (SFA) and/or increase highly unsaturated fatty acids (HUFA) esterified to phospholipids. Whereas it is known that winter dormant species do not undergo such lipid remodeling, no studies have investigated winter facultative quiescence. The northern quahog (*Mercenaria mercenaria*) enters cold induced quiescence (closed valves, no filter-feeding) during winter when temperatures decrease below 6–7°C and exhibit signs of physiological stress. The species can operate cold induced lipid remodeling between 23 to 0°C, with most of the changes occurring between 23 and 8°C i.e. before entering the quiescent state. We designed this study to investigate whether *M. mercenaria* further performs lipid remodeling when temperatures continue to decrease after entrance into quiescence. Individual *M. mercenaria* were cultured together with two evolutionarily — related (veneroid) sympatric cold-active species (*Spisula solidissima* and *Arctica islandica*), and exposed to an annual temperature change between 12°C and 2°C. *M. mercenaria* were sampled in late autumn (start of the 2°C winter temperature plateau), and all three species were sampled in late winter (end of 2°C plateau), and again in late summer (end of 12°C plateau). Gill membrane carbon chain composition (fatty acids + alkenyl chains) was analyzed separately (GC-MS + GC-FID) for mitochondria and other sources of cell membranes (non-mitochondrial). Valve opening was monitored visually in all species, and measurements of markers of lipoxidation (lipid hydroperoxides and TBARS) were taken in *M. mercenaria* for each of the three sampling points of the years. Individuals of *M. mercenaria* presented the previously described pattern of valve closure and physiological stress (increased lipoxidation) during winter when temperatures decreased below 6–7°C. Cold induced lipid remodeling for this species was contradictory to expectations for a winter active ectotherm i.e. the chain fluidity index and mol% of HUFA were lower during winter than summer. In contrast, none of the cold tolerant species ceased filter-feeding during winter and both operated cold induced lipid remodeling in the expected direction in their mitochondrial membrane i.e. higher chain fluidity index (*S. solidissima*) and/or higher mol% HUFA (*A. islandica*) during winter. Our results show that *M. mercenaria* ceased to resort to lipid remodeling when temperatures continued to decrease below the threshold eliciting quiescence. The pace of membrane bound processes may be finely coordinated with the level of activity of the whole organism.

4.3 Introduction

Low temperatures increase the packing order of structural lipids forming biological membranes, decreasing the overall membrane fluidity. This reduces the rate of membrane-bound processes through reduction of ion permeability and integral enzymes lateral diffusion, rotation, and conformational changes (Hochachka & Somero 2002). Winter active ectotherms undergo membrane lipids remodelling termed “Homeoviscous adaptation” (HVA) to counteract these effects during the cold season. HVA can include a change in the proportion of membrane PL polar head groups (Hazel & Landrey 1988), cholesterol content, FA position (*sn*-1 or *sn*-2), or the average chain length (Hazel & Williams 1990). The most studied of these changes (and perhaps most prevalent) is however the increase in the number of carbon-carbon double bonds of FA chains (reviewed in Hazel & Williams 1990; Hochachka & Somero 2002; Moyes & Ballantyne, 2011). The addition of a first double bond on a carbon chain creates a kink that increases lateral area and decreases membrane viscosity. Addition of a second double bond has been shown to further reduce viscosity by half the importance of the addition of the first double bond, whereas addition of a third (or more) double bond as found in some polyunsaturated fatty acids (PUFA), have minor (or negative) effects on membrane fluidity (Coolbear et al. 1983). Winter active bivalves (and planktonic crustacean species) have been found to specifically increase the proportion of highly unsaturated FA (HUFA) such as eicosapentaenoic acid (EPA), and/or docosahexaenoic acid (DHA) in membrane (Hall et al. 2002; Pernet et al. 2006; Parent et al. 2008). Such response may however

go beyond HVA; in the case of DHA, specific lipid-protein interaction has been found to regulate (increase) Na(+)K(+)ATPase (Turner et al. 2003), and rhodopsin (Grossfield et al. 2006) activity. In contrast to winter active species, winter dormant species investigated so far did not present signs of HVA or HUFA increase, or did so to a much lesser extent (Farkas 1979; Farkas et al. 1982; Pruitt 1988). Here we investigate if cold induced lipid remodelling is achieved by species entering facultative quiescence during winter.

The northern quahog, *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758), is a suspension-feeding bivalve found in shallow and turbid estuarine environments from the Florida Keys to the southern part of the Gulf of St. Lawrence, Canada (Kraeuter & Castagna 2001). In the northernmost limits of this species range of distribution winter temperatures below 6—7°C cause arrested filter-feeding (Ansell 1964; Ansell 1968; Bardach et al. 1972; Grizzle et al. 2001). A complete valve closure have been observed below 2–3°C (Bricelj et al. 2006), but this may accompany arrested filter-feeding as soon as the threshold of 6—7°C is reached. Signs of slight physiological stress have been noticed during this quiescent state, those include recruitment of HSP40 and HSP70 chaperones and juvenile mortality (Bricelj et al. 2006). Adult *M. mercenaria* were previously found to increase gill membrane HUFA (DHA and EPA) content when water temperature decreased from 22 to 0°C, with most of the changes occurring before entrance into quiescence i.e. between 20 and 8°C (Parent et al. 2008). Here, we investigate if lipid remodeling based on FA compositional changes

(HVA or HUFA increase) occurs in the narrow range of temperature of 12 to 2°C i.e. from above to below the temperature threshold eliciting quiescence in this species. We compared the response of *M. mercenaria* with that of two cold-active species representing positive controls for the capacity to undergo lipid remodeling in our housing conditions. The Atlantic surfclam, *Spisula solidissima* (Dillwyn, 1817) remains active at temperatures as low as 2°C. The species shares a common northern limit with *M. mercenaria* in Canada, but seems less adapted to high temperatures as its southern distribution is limited to Cape Hatteras (NC, USA; Weinberg 2005). The ocean quahog, *Arctica islandica* (Linnaeus, 1767), is a very slow-growing species that do not extends further south than *S. solidissima*, but may tolerate colder temperatures as it is found as far north as Iceland, where some populations achieve their entire life cycle below 7–8°C (Basova et al. 2012). None of these cold-active species have previously been investigated for their capacity to undergo cold-induced lipid remodeling. We predicted that only the two cold tolerant species would undergo any type of lipid remodelling in the specific range of temperature investigated.

To test this prediction, we housed individuals of each species in open flow water tanks supplied with the marine station seawater naturally fluctuating between 12 and 2°C from summer to winter. We monitored valve opening in all species and markers of lipid peroxidation in *M. mercenaria*, and we analysed gill PL FA of all species. This lipid analysis was made separately for mitochondria and other sources of cell membranes as to increase sensitivity in detecting lipid remodelling in our

species. This is because mitochondria has been observed to perform more extensive cold induced lipid remodeling than other membranes (Hazel & Williams 1990).

4.4 Material and methods

4.4.1 Animals

Mercenaria mercenaria were collected on the beach at Neguac, New Brunswick (Canada) (47° 15'N, 65°04'W) and shipped to the Station aquicole de l'ISMER in Pointe-au-Père, Rimouski, Québec (Canada). *Spisula solidissima* and *Arctica islandica* were collected by a diver in the Îles-de-la-Madeleine, Québec (Canada) at the following locations and depths: *S.s.*, 47°32'N, 61°37'W at 5 m; *A.i.* 47° 21'N, 61°45'W at 15 m, and air-shipped to the ISMER station. Upon arrival, clams were numbered and placed in an open flow-through, two-tank system containing 20 cm of sand. In addition to the natural phytoplankton remaining in the semi-filtered (50 µm) water of the station, bivalves were fed a mixed suspension of live microalgae (12% *Nannochloropsis* sp., 44% *Isochrysis galbana*, and 44% *Pavlova lutheri* in cell number) purchased from NutrOcéan Inc. (Québec, Canada). Microalgae were provided between April and December at 1% body mass/d at 8°C, and adjusted for the temperature following a Q₁₀ of 2.5. Salinity at the station remains at 29 throughout most of the year but decreases to 23–24 during peak ice melt in April. This salinity corresponds to the natural estuarine environment of *M.*

mercenaria at which the highest rates of water pumping are reached (Hamwi & Haskin 1969).

Individuals were collected during summer and a first group of *M. mercenaria* were dissected for analysis in early December (autumn point), when water temperature had just reached its annual low of 2°C. Individuals of all three species were sampled in early April (winter point), when water temperature had been stable at its annual minimum of 2°C for four months, which should have ensure full acclimation to cold. A second group of individuals of each species was sampled in late August (summer) of the following summer, when water temperature had been stable at its highest value of 12°C for one month (to ensure full acclimation to warm water). Clams were inspected for valve opening twice a week during autumn and winter.

4.4.2 Mitochondrial isolation

Mitochondria were isolated as described in Munro & Blier (2012). Briefly, gills were removed, rinsed with isotonic solution, minced with a razor blade, and homogenized with three passes of a loose motor driven Potter-Elvehjem. An aliquot of the homogenate was conserved at -80°C for lipoxidation marker assays. The remaining homogenate was centrifuged at 1250 *g* for 10 min and the supernatant was removed and conserved. The pellet of cell debris was suspended in 15 mL of homogenization buffer and centrifuged again at 1 000 *g* for 10 min; this second supernatant was removed and pooled with the first. The two supernatants were combined and a first centrifugation was run at 1250 *g* for 10 min to eliminate residual cellular debris. The final supernatant was centrifuged at 10500 *g* for 15 min to recover the mitochondrial pellet. All homogenization and centrifugation steps were carried out at 4°C. Both biological fractions were held at -80°C under nitrogen until lipid extraction. The non-mitochondrial fraction (washed cellular debris) was assayed

for mitochondrial-specific enzymes (NADH dependent-reduction of iodonitrotetrazolium, complexes I to III assay), and was found essentially devoid of mitochondria (Munro & Blier 2012). An aliquot of this fraction was kept for membrane lipid analysis and lipid hydroperoxide assays.

4.4.3 Lipoxidation

TBARS were assayed in the gill homogenate using the OXitek TBARS assay kit (Zeptometrix, Buffalo, NY). Fluorescence of the reaction product was read using a Hitachi F2500 fluorometer with excitation/emission set at 530/550 nm. MDA equivalent values were obtained by reference to a standard curve (MDA standard).

Since LOOH are membrane bound, LPO assays (Cayman Chemicals, Cedarlane Lab, Burlington, ON, Canada) could be carried out using the non-mitochondrial fraction (cellular debris), which permitted minimizing the amount of homogenate taken before mitochondrial recovery. Results for this assay thus represent levels of LOOH in the non-mitochondrial membranes of the cell. Lipids are first extracted in deoxygenated chloroform, and LOOH are measured by the amount of ferrous ion (Fe^{2+}) oxidized to ferric ion (Fe^{3+}), which subsequently reacts with ammonium thiocyanate (SCN) to produce the chromogenic $\text{Fe}(\text{SCN})_5^{2-}$ (peak absorbance at 500 nm). Absorbance was read with an Ultrospec 2100 spectrophotometer, and values were obtained from reference to an LOOH (13-HpODE) standard curve.

4.4.4 Lipid analysis

We analyzed the total carbon chain composition (acyl + alkenyl chains) of PL from mitochondrial and non-mitochondrial membranes. Total lipids were extracted in two parts dichloromethane and one part methanol (Cequier-Sanchez et al. 2008) using a pre-cooled glass/glass hand-operated Potter-Elvehjem. The dichloromethane

fraction was evaporated to ca 250µl under nitrogen flow and transferred to a microcolumn of deactivated silica gel (5% water W/W; 60 Å, mesh 150–230). Neutral lipids were eluted with 10 ml of CHCl₃:MeOH (98:2), and polar lipids were recovered using 6 ml of CHCl₃:MeOH:H₂O (5:5:1), to which 600µl of CHCl₃ was added to achieve phase separation. The CHCl₃ fraction was evaporated to dryness, and 1.5ml of 10% boron trifluoride-methanol (SUPELCO, Bellefonte, PA) was added. Trans-methylation was achieved at 90°C for 45 min followed by the addition of NaOH to avoid the reversal of DMA to their corresponding aldehydes (Morrison & Smith 1964). Solvents were HPLC grade or better.

The resulting FA methyl esters (FAME) and DMA were recovered in hexanes and analyzed by GC-MS (GC: AGILENT 6850 series II; MS: AGILENT 5975 B) using a high polarity column (HP-88 60 m, 0.25 mm × 0.20 µm) with the MS at EI mode 70eV. Calibration of the system was performed using regular FA mix standards (SUPELCO 37 FAME), marine FA standards (SUPELCO), and DMA standards (SIGMA-Aldrich). DMA are easily distinguished from FAME by the strong dominance of the McLafferty rearrangement ion at $M/Z=75$. Information on chain length and unsaturation are provided by the ion at $[M-31]^+$, corresponding to the loss of a methoxyl (see Maulik et al., 1993 for mass spectra). Since triglycerids were eliminated from the analysis and only PL were subjected to methylation, the percentage of plasmalogens among phospholipids is simply double the percentage of DMA among the total carbon chains (Bueno et al. 2012).

4.4.5 Statistical analysis

Significant differences (alpha = 0.05) between TBARS, LOOH, carbon chain mol% and related indexes values for the three seasons in *M. mercenaria* were determined using ANOVA. Where significant differences were found among seasons, Tukey-Kramer HSD was used to provide *P*-values for pair comparisons. For *S. solidissima* and *A. islandica*, carbon chain mol% and related indexes were compared

between summer and winter using Student's *t*-test. Homogeneity of variance was estimated using the Brown-Forsythe test and values were \log_{10} transformed when not normally distributed. When homogeneity of variance could not be reached after variable transformation, significant differences were determined by a Kruskal-Wallis test for comparison among the three season in *M. mercenaria*, or by Wilcoxon test for comparison between winter and summer in *S. solidissima* and *A. islandica*. When the Kruskal-Wallis test was significant, a Steel-Dwass all-pair comparison was used to provide *P*-values for pair comparisons. All analyses were performed using the JMP v10.0 statistical package (SAS Institute Inc.). Results are presented as means \pm SEM.

4.5 Results

Table 4.1 presents the life history traits of the three species investigated. Routine inspection (twice a week) of the tanks revealed that all *S. solidissima* ($n = 33$) were actively filter-feeding throughout autumn and winter. *A. islandica* ($n = 22$) cycled between filter-feeding at the sediment surface and burrowing, which is typical of this species (Taylor 1976). Nonetheless, at least some individuals were observed filter-feeding at each routine inspection. In contrast, *M. mercenaria* individuals ($n = 22$) gradually ceased filter-feeding when seawater temperature decreased to 7°C, and none was observed filter-feeding when temperature decreased below 4°C (between November and May).

Table 4.1 Life history traits of the three species investigated.

Species	Common name	Climate type ^a	Water temperature range (°C) ^b	Growth rate (K; VBGF) ^c	Longevity (y) ^d	Maximum length (mm) ^e	Length of sampled individuals (mm)	
							Rang ^e	Mean ± SD
<i>Spisula solidissima</i>	Atlantic surfclam	Temperate	-1.4 to 21.0	0.269	37	130	119–136	125.0 ± 7.8
<i>Mercenaria mercenaria</i>	Northern quahog	Tropical to temperate	0 to 17	0.065	106	91	64–91	78.1 ± 5.9
<i>Arctica islandica</i>	Ocean quahog	Temperate to polar	-1.4 to 21.3	0.05	507	97	80–94	88.7 ± 4.5

^a Data from Weinberg (2005), Kraeuter & Castagna (2001), and Dahlgren et al. (2000)

^b Values are for the population where individuals have been sampled. Source for *S. solidissima* and *A. islandica*: Dr M. Nadeau (Mérinov, Gaspé, Québec), personal communication; for *M. mercenaria*: Observatoire global du Saint-Laurent-OGSL, <http://ogsl.ca> (2013)

^c VBGF: Von Bertalanffy growth function. K values: *S. solidissima* is from Giguère et al. (2005); *M. mercenaria* is the mean for three populations near Prince Edward Island (Landry et al. 1993); *A. islandica* is from nearby population (Sable Bank; Kilada et al. (2007).

^d Maximum reported longevity. Value for *S. solidissima* is from Sephton & Bryan (1990); for *M. mercenaria* from Ridgway et al. (2011); for *A. islandica* from Butler et al. (2013).

^e *S. solidissima*: maximum length reported from fishery management reports for the sampled population; *A. islandica*: maximum size observed among 58 individuals collected by a diver instructed to collect only large individuals; *M. mercenaria*: maximum size observed among 52 individuals collected by hand while looking for adult-sized individuals.

Results for lipoxidation assays in gill tissues of *M. mercenaria*, are presented in figure 4.1. LPO assays measures lipid hydroperoxides (LOOH) that are membrane bound unstable secondary products of PUFA oxidation (Lushchak et al. 2012). TBARS assays mostly measure malondialdehydes (MDA), a stable water soluble end product of PUFA lipoxidation eliminated by excretion. Both LOOH and MDA were at their highest level in autumn, when water temperature just reached the winter plateau of 2°C. At the end of winter they significantly decreased, but the short term marker (LOOH) had decreased to a larger extent than the medium term one (TBARS). At the end of the summer, both were equally low compared to autumn value. We also measured LOOH and TBARS in the two cold tolerant species for the winter season (data not presented), and the values were lower than for *M. mercenaria*. We conclude that the cold tolerant species remained active and that *M. mercenaria*

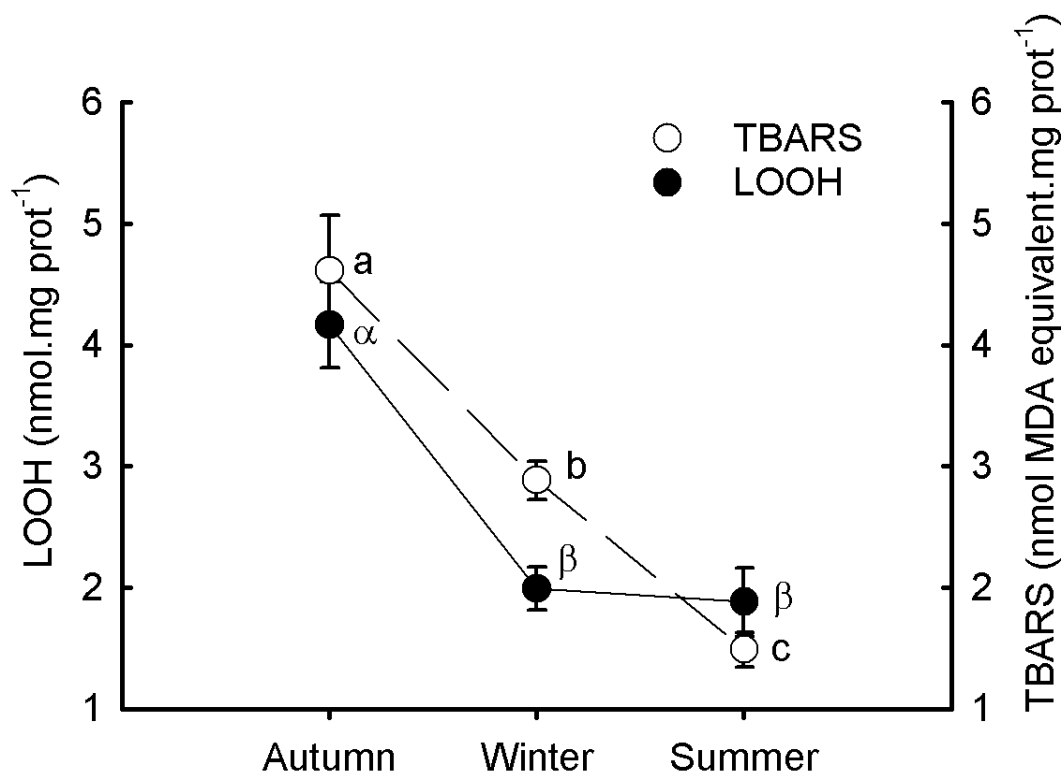


Figure 4.1 Markers of lipoxidation in gills of *M. mercenaria* at three time points of the year. LOOH, lipid hydroperoxides; TBARS, thiobarbituric acids reactive substance. Autumn = early December (2°C), winter = early April (2°C), summer = late August (12°C). Different letters and Greek letters indicate significant differences among seasons for TBARS and LOOH respectively (Tukey's post-hoc HSD). Winter data: n = 7 for LOOH, and 6 for TBARS; all others: n = 8. Results are means \pm SEM.

gradually entered quiescence during autumn, which was maintained for the winter period, while presenting signs of cold associated-physiological stress, as previously described for the species.

Using GC-MS, we analyzed the carbon chain (acyl + alkenyl) composition of gill mitochondrial and non-mitochondrial PL. Derivatization produced FAME from the

FA esterified at the *sn*-1 and *sn*-2 position of diacylphospholipids, and *sn*-2 position of plasmalogen PL. It also produced DMA from the alkenyl chains at the *sn*-1 position of plasmalogens PL. Tables 4.2 and 4.3 present the significant differences among seasons for individual carbon chains (mol%) and related indexes. Briefly, the carbon chain composition of the three Veneroid bivalves comprises saturated FA (SFA, 13–29%), monounsaturated FA (MUFA, 8–30%), non-methylene interrupted fatty acids (NMI FA, 10–20%), and PUFA (22–34%, mostly arachidonic acid, EPA, and DHA), with negligible proportions of FA of two or three double bonds. Therefore, when NMI are not included in PUFA, PUFA are almost exclusively made of HUFA. DMA represented between 25 and 30% of all carbon chains among the three species.

Table 4.2 Fatty acid and dimethyl acetals (DMA) composition (mol%) of phospholipids from gill mitochondria. Individuals were housed in tanks during summer and sampled during autumn (*M. mercenaria* only, early December, 2°C), winter (early April, 2°C), and the following summer (late August, 12°C).

	<i>S. solidissima</i>		<i>M. mercenaria</i> ^a			<i>A. islandica</i>	
	Winter (n = 8)	Summer (n = 8)	Autumn (n = 8)	Winter (n = 9)	Summer (n = 8)	Winter (n = 9)	Summer (n = 8)
Individual carbon chains							
9:0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1
12:0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0a	0.3 ± 0.1a	0.0 ± 0.0b	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1
14:0	1.1 ± 0.2	1.5 ± 0.1*	0.3 ± 0.0a	0.6 ± 0.0b	0.2 ± 0.0a	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0
15:0	0.4 ± 0.0	0.8 ± 0.1**	0.1 ± 0.0a	0.2 ± 0.0b	0.2 ± 0.0b	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0
16:0	5.9 ± 0.3	6.0 ± 0.2	12.4 ± 0.5ab	13.0 ± 0.7a	10.9 ± 0.2b	6.4 ± 0.4	5.8 ± 0.4
17:0iso	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0*	1.4 ± 0.0a	1.4 ± 0.1a	2.4 ± 0.1b	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0
16:1n7	0.9 ± 0.1	1.3 ± 0.1*	1.1 ± 0.1b	1.4 ± 0.1a	0.0 ± 0.0c	0.5 ± 0.0	1.0 ± 0.2*
17:0	0.8 ± 0.1	1.2 ± 0.1*	1.3 ± 0.1ab	1.1 ± 0.0a	1.5 ± 0.1b	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.1
18:0	4.9 ± 0.1	5.6 ± 0.3*	5.1 ± 0.2ab	4.5 ± 0.2a	5.2 ± 0.2b	6.3 ± 0.3	5.8 ± 0.2
18:1n13	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	4.9 ± 0.3	4.9 ± 0.2
18:1n9	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.8 ± 0.1a	1.4 ± 0.0b	0.8 ± 0.0a	1.2 ± 0.1	1.8 ± 0.1**
18:1n7	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	1.1 ± 0.1a	0.8 ± 0.0b	1.4 ± 0.1a	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.2
18:2n6	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0**	0.2 ± 0.0a	0.6 ± 0.0b	0.1 ± 0.0a	0.2 ± 0.0	0.5 ± 0.0**
20:1n11	3.9 ± 0.1	5.1 ± 0.3**	1.0 ± 0.0a	0.9 ± 0.1a	1.9 ± 0.1b	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.0**
20:1n9	2.2 ± 0.1	2.9 ± 0.2**	0.4 ± 0.1a	0.8 ± 0.0b	0.9 ± 0.1b	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.1
20:1n7	1.4 ± 0.0	1.6 ± 0.2	0.9 ± 0.1a	0.6 ± 0.0b	0.9 ± 0.1a	3.1 ± 0.2	3.2 ± 0.3
20:2n6	0.5 ± 0.0	1.0 ± 0.1**	0.6 ± 0.0a	0.7 ± 0.0b	0.6 ± 0.0a	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.0**
20:4n6	2.5 ± 0.1	2.4 ± 0.1	4.0 ± 0.2a	3.7 ± 0.2a	5.2 ± 0.2b	2.9 ± 0.1	3.2 ± 0.2
20:5n3 (EPA)	8.7 ± 0.4	5.5 ± 0.2**	9.0 ± 0.4a	6.0 ± 0.2b	9.4 ± 0.4a	7.6 ± 0.3	6.1 ± 0.5*
22:4n6	2.6 ± 0.1	2.5 ± 0.2	2.2 ± 0.2a	2.6 ± 0.1b	2.9 ± 0.1b	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.1
22:5n6	2.6 ± 0.2	1.8 ± 0.2*	1.5 ± 0.0a	1.7 ± 0.1a	2.1 ± 0.1b	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.2
22:5n3	3.0 ± 0.2	3.4 ± 0.4	1.4 ± 0.2a	1.5 ± 0.1a	2.2 ± 0.2b	1.1 ± 0.0	0.9 ± 0.1*
22:6n3 (DHA)	14.8 ± 0.6	16.6 ± 1	14.9 ± 0.6a	13.0 ± 0.4b	12.5 ± 0.4b	12.0 ± 0.4	10.8 ± 0.6
NMI 20:2 (Δ5,11)	2.3 ± 0.1	2.1 ± 0.1	0.02 ± 0.0b	0.10 ± 0.0a	0.0 ± 0.0c	9.8 ± 0.4	10.5 ± 0.4
NMI 20:2 (Δ 5,13)	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1b	0.8 ± 0.1a	0.0 ± 0.0c	4.2 ± 0.2	3.8 ± 0.2

NMI 22:2 (Δ 7,13)	6.8 \pm 0.2	7.1 \pm 0.3	1.3 \pm 0.1a	2.0 \pm 0.1b	1.6 \pm 0.1a	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
NMI 22:2 (Δ 7,15)	2.4 \pm 0.1	2.5 \pm 0.1	8.6 \pm 0.4a	7.5 \pm 0.2b	9.2 \pm 0.2a	4.5 \pm 0.2	5.7 \pm 0.2**
NMI 22:3 (Δ 7,13,16)	1.2 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1**	0.9 \pm 0.1a	1.1 \pm 0.1b	0.8 \pm 0.0a	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
DMA 16:0	0.2 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	1.1 \pm 0.0a	1.4 \pm 0.1b	1.4 \pm 0.1b	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0
DMA_17:0iso	0.3 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0*	4.9 \pm 0.2ab	5.5 \pm 0.2a	4.5 \pm 0.2b	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0
DMA_17:0anteiso	0.1 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	2.1 \pm 0.1a	2.7 \pm 0.1b	2.0 \pm 0.1a	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
DMA 17:0	0.2 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0**	1.0 \pm 0.0a	1.2 \pm 0.1b	0.9 \pm 0.0a	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0
DMA_18:0iso	1.2 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1	2.8 \pm 0.1	3.1 \pm 0.1	3.1 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1
DMA 18:0	9.3 \pm 0.3	8.7 \pm 0.3	10.8 \pm 0.6a	10.9 \pm 0.5a	8.5 \pm 0.5b	7.6 \pm 0.3	7.3 \pm 0.4
DMA 19:0iso	0.3 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	0.6 \pm 0.0	0.7 \pm 0.0	0.7 \pm 0.0	0.8 \pm 0.0	0.9 \pm 0.1
DMA_20:1anteiso	2.5 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1*	0.04 \pm 0.0a	0.10 \pm 0.0a	0.00 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
DMA 20:1	11.5 \pm 0.4	9.9 \pm 0.6	2.2 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1	2.3 \pm 0.1	16.2 \pm 0.5	16.4 \pm 0.4
Summations or indexes							
Branched carb. chain	5.2 \pm 0.2	5.3 \pm 0.2	13.2 \pm 0.4a	15.2 \pm 0.6b	14.4 \pm 0.4ab	3.5 \pm 0.2	3.8 \pm 0.3
Branched FA	0.6 \pm 0.0	0.8 \pm 0.1*	2.3 \pm 0.1a	2.5 \pm 0.1a	3.7 \pm 0.1b	1.1 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1
Branched DMA	4.7 \pm 0.2	4.6 \pm 0.2	11.0 \pm 0.4a	12.7 \pm 0.5b	10.7 \pm 0.4a	2.4 \pm 0.1	2.6 \pm 0.2
FA < 1% ^b	1.4 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1**	1.8 \pm 0.1a	2.2 \pm 0.1b	2.1 \pm 0.0ab	1.4 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1
DMA < 1% ^c	1.1 \pm 0.0	0.9 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1a	1.4 \pm 0.1b	1.2 \pm 0.0ab	0.7 \pm 0.0	0.6 \pm 0.1
Saturated carb. chain	26.4 \pm 0.5	28.4 \pm 0.4*	46.3 \pm 0.8ab	48.9 \pm 0.8a	43.8 \pm 0.7b	27.3 \pm 0.8	26.3 \pm 0.7
Saturated FA	13.9 \pm 0.5	16.2 \pm 0.5**	22.0 \pm 0.6	22.3 \pm 1.1	22 \pm 0.3	16.6 \pm 0.9	15.7 \pm 0.6
Saturated DMA	12.5 \pm 0.4	12.2 \pm 0.4	24.4 \pm 1ab	26.6 \pm 1a	21.8 \pm 0.9b	10.7 \pm 0.3	10.5 \pm 0.6
Monounsatur. carb. chain	23.3 \pm 0.5	23.4 \pm 1	6.8 \pm 0.1a	7.1 \pm 0.2a	8.8 \pm 0.2b	27.2 \pm 0.5	28.5 \pm 0.4
Monounsatur. FA	9.2 \pm 0.2	11.2 \pm 0.5**	4.3 \pm 0.1a	4.8 \pm 0.1a	6.1 \pm 0.2b	11.0 \pm 0.3	12.1 \pm 0.5
Monounsatur. DMA	14.2 \pm 0.4	12.2 \pm 0.8*	2.4 \pm 0.1	2.3 \pm 0.1	2.7 \pm 0.1	16.2 \pm 0.5	16.5 \pm 0.4
FA dienes (without NMI)	0.9 \pm 0.0	1.1 \pm 0.1	0.8 \pm 0.0a	1.3 \pm 0.0b	0.7 \pm 0.0a	0.8 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1**
FA trienes (without NMI)	0.5 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0**	0.3 \pm 0.0a	0.6 \pm 0.0b	0.2 \pm 0.0a	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0
FA tetraenes	5.1 \pm 0.2	4.9 \pm 0.2	6.1 \pm 0.2a	6.3 \pm 0.2a	8.1 \pm 0.2b	3.3 \pm 0.1	3.7 \pm 0.3
FA pentaenes	14.5 \pm 0.4	10.8 \pm 0.3**	12.1 \pm 0.6b	9.3 \pm 0.3a	13.9 \pm 0.4c	9.8 \pm 0.4	8.0 \pm 0.5*
HUFA^d	34.3 \pm 0.7	32.2 \pm 1.1	33.2 \pm 1.2a	28.6 \pm 0.7b	34.5 \pm 0.8a	25.2 \pm 0.5	22.5 \pm 0.9*
n-6 PUFA	8.7 \pm 0.4	7.8 \pm 0.4	8.6 \pm 0.2a	9.4 \pm 0.3a	11.0 \pm 0.2b	5.1 \pm 0.1	5.9 \pm 0.4
n-3 PUFA	27 \pm 0.5	25.7 \pm 1.2	25.8 \pm 1a	21.1 \pm 0.6b	24.4 \pm 0.7a	21.0 \pm 0.5	17.9 \pm 1.0*

NMI	13.4 ± 0.3	13.2 ± 0.4	11.5 ± 0.4	11.9 ± 0.3	11.9 ± 0.3	18.8 ± 0.6	20.4 ± 0.3*
DMA	26.7 ± 0.5	24.4 ± 1	26.8 ± 1.1ab	28.9 ± 1a	24.5 ± 1b	27.0 ± 0.7	27.0 ± 0.9
Unsaturation index ^e	235.9 ± 3.3	226.3 ± 4.6	208.1 ± 5.5a	186.5 ± 3.9b	212.8 ± 3.9a	201.8 ± 2.6	191.8 ± 4.3
Unsaturation ratio	2.8 ± 0.1	2.5 ± 0.1*	1.2 ± 0.0ab	1.0 ± 0.0a	1.3 ± 0.0b	2.7 ± 0.1	2.8 ± 0.1
Chain fluidity index ^f	97.0 ± 0.8	93.6 ± 0.5**	75.5 ± 1.2b	70.8 ± 1.2a	79.9 ± 1.0c	94.7 ± 1.0	94.8 ± 0.8
Average chain length	19.8 ± 0.0	19.7 ± 0.0	19.2 ± 0.0a	19.0 ± 0.0b	19.3 ± 0.0a	19.4 ± 0.0	19.4 ± 0.0
20-22 carb. chains	70.1 ± 0.7	68.4 ± 0.4	50.3 ± 0.7b	46.1 ± 0.8a	53.2 ± 0.6c	64.7 ± 0.9	64.3 ± 0.5
≤ 16 carb. chains	8.4 ± 0.4	9.4 ± 0.4	15.0 ± 0.5ab	16.5 ± 0.8b	13.6 ± 0.2a	8.5 ± 0.6	7.7 ± 0.5

Different letters indicate significant differences ($\alpha = 0.05$) among seasons for *M. mercenaria* (Tukey's post-hoc HSD or Steel-Dwass all-pair comparison), and asterisks indicate significant differences (*: P -value < 0.05; **: P -value < 0.01; Student's t -test or Wilcoxon) between seasons for *S. solidissima* and *A. islandica*. Results are presented as mean ± SEM.

^a Tissues from two individuals were pooled for each replicate.

^b Fatty acids never greater than 1% abundance. This includes 10:0, 16:0iso, 17:0anteiso, 18:0iso, 20:0, 18:3n3, 20:3n6, 21:5n3, NMI 20:2iso, and NMI 20:3.

^c DMA never greater than 1% abundance. This includes 9:0, 15:0, 16:0iso, 18:0anteiso, 18:1, 19:0, 20:0, 20:1iso, and 20:2.

^d Highly unsaturated fatty acids: fatty acids with four or more double bonds.

^e Unsaturation index = $\sum mi \cdot ni$, where mi is the mole percentage and ni the number of double bonds of the carbon chain (FA or DMA) i .

^f Chain fluidity index = $1 * (\% \text{ monounsaturated chains}) + 1.5 * (\% \text{ polyunsaturated chains})$.

Table 4.3 Fatty acid and DMA composition (mol%) of phospholipids from gill non-mitochondrial membranes. See Table 2 for details.

	<i>S. solidissima</i>		<i>M. mercenaria</i> ^a			<i>A. islandica</i>	
	Winter (n = 8)	Summer (n = 8)	Autumn (n = 8)	Winter (n = 8)	Summer (n = 8)	Winter (n = 8)	Summer (n = 8)
Individual carbon chains							
9:0	1.0 ± 0.5	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.0b	1.2 ± 0.4a	0.0 ± 0.0c	0.8 ± 0.2	0.4 ± 0.2
12:0	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0b	0.5 ± 0.2a	0.0 ± 0.0c	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1
14:0	2.1 ± 0.1	3.0 ± 0.2**	0.3 ± 0.0b	0.8 ± 0.1a	0.1 ± 0.0c	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.0
15:0	0.7 ± 0.0	1.3 ± 0.1**	0.21 ± 0.0b	0.33 ± 0.1a	0.17 ± 0.0c	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0
16:0	8.7 ± 0.4	9.3 ± 0.3	13.8 ± 0.3a	16.2 ± 1.1a	11.5 ± 0.2b	8.9 ± 0.4	8.5 ± 0.3
17:0iso	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0**	1.5 ± 0.0a	1.7 ± 0.0b	2.4 ± 0.1a	0.7 ± 0.0	0.8 ± 0.0**
16:1n7	1.3 ± 0.1	1.9 ± 0.1**	1.5 ± 0.1a	1.6 ± 0.1a	0.0 ± 0.0b	1.1 ± 0.2	1.6 ± 0.2
17:0	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1a	1.3 ± 0.1a	1.8 ± 0.1b	1.7 ± 0.1	1.4 ± 0.1
18:0	5.9 ± 0.2	6.5 ± 0.2*	4.2 ± 0.1a	5.8 ± 0.5b	4.1 ± 0.1a	7.6 ± 0.3	6.9 ± 0.2
18:1n13	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0ab	0.1 ± 0.0a	0.0 ± 0.0b	3.9 ± 0.1	3.8 ± 0.1
18:1n9	1.9 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1a	1.9 ± 0.1b	1.1 ± 0.1a	1.9 ± 0.2	2.4 ± 0.1*
18:1n7	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.1	1.2 ± 0.0a	0.8 ± 0.0b	1.5 ± 0.1a	2.1 ± 0.2	2.0 ± 0.2
18:2n6	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0**	0.2 ± 0.0b	0.6 ± 0.1a	0.0 ± 0.0c	0.3 ± 0.0	0.6 ± 0.1**
20:1n11	3.5 ± 0.1	4.6 ± 0.2**	1.1 ± 0.0a	1.0 ± 0.0a	2.0 ± 0.1b	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.0**
20:1n9	2.5 ± 0.1	3.4 ± 0.1**	0.6 ± 0.1a	0.8 ± 0.1b	0.9 ± 0.1b	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.1
20:1n7	1.8 ± 0.1	2.2 ± 0.1**	1.2 ± 0.1a	0.8 ± 0.0b	1.0 ± 0.1ab	4.0 ± 0.2	4.0 ± 0.2
20:2n6	0.6 ± 0.0	0.9 ± 0.1*	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.8 ± 0.0**
20:4n6	2.6 ± 0.1	2.9 ± 0.1*	4.3 ± 0.2b	3.2 ± 0.2a	5.7 ± 0.1c	2.9 ± 0.1	3.2 ± 0.2
20:5n3 (EPA)	6.8 ± 0.5	4.4 ± 0.3**	6.6 ± 0.2a	3.6 ± 0.2b	6.9 ± 0.3a	8.0 ± 0.4	6.9 ± 0.5
22:4n6	2.3 ± 0.2	2.7 ± 0.1	2.5 ± 0.1a	2.7 ± 0.2a	3.4 ± 0.1b	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.1
22:5n6	1.9 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.4 ± 0.0a	1.4 ± 0.1a	1.9 ± 0.1b	0.6 ± 0.1	1.1 ± 0.1**
22:5n3	3.4 ± 0.1	4.1 ± 0.3	2.1 ± 0.1a	1.8 ± 0.1a	2.7 ± 0.2b	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1
22:6n3 (DHA)	14.5 ± 0.7	15.9 ± 1.3	12.4 ± 0.3a	10.2 ± 0.4b	11.1 ± 0.3b	11.6 ± 0.7	12.2 ± 0.3
NMI 20:2 (Δ5,11)	2.0 ± 0.1	1.5 ± 0.1**	0.0 ± 0.0a	0.0 ± 0.0a	0.1 ± 0.0b	8.1 ± 0.2	8.2 ± 0.3

NMI 20:2 (Δ 5,13)	0.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1a	0.9 \pm 0.1a	0.2 \pm 0.1b	3.4 \pm 0.2	3.2 \pm 0.1
NMI 22:2 (Δ 7,13)	5.1 \pm 0.2	5.2 \pm 0.2	1.2 \pm 0.1a	1.7 \pm 0.1b	1.3 \pm 0.1ab	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0
NMI 22:2 (Δ 7,15)	1.8 \pm 0.1	2.0 \pm 0.1	8.4 \pm 0.3a	6.9 \pm 0.5b	9.7 \pm 0.2a	3.4 \pm 0.5	4.2 \pm 0.1
NMI 22:3 (Δ 7,13,16)	0.9 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1	0.9 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
DMA 16:0	0.3 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	1.3 \pm 0.0	1.4 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0
DMA_17:0iso	0.3 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	5.2 \pm 0.1	5.4 \pm 0.2	5.0 \pm 0.2	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0
DMA_17:0anteiso	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	2.4 \pm 0.0ab	2.7 \pm 0.1a	2.3 \pm 0.1b	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0
DMA 17:0	0.2 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0**	1.0 \pm 0.0ab	1.1 \pm 0.1a	0.9 \pm 0.0b	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0
DMA_18:0iso	1.1 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	3.0 \pm 0.0a	3.1 \pm 0.2a	3.6 \pm 0.1b	1.2 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1
DMA 18:0	7.6 \pm 0.2	6.2 \pm 0.4*	11.1 \pm 0.5	10.2 \pm 0.6	9.3 \pm 0.4	6.1 \pm 0.2	5.8 \pm 0.3
DMA 19:0iso	0.3 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.7 \pm 0.0	0.7 \pm 0.0	0.7 \pm 0.0	0.7 \pm 0.0	0.7 \pm 0.1
DMA_20:1anteiso	2.3 \pm 0.2	1.6 \pm 0.1**	0.05 \pm 0.0a	0.03 \pm 0.0a	0.00 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
DMA 20:1	10.4 \pm 0.4	8.0 \pm 0.5**	2.4 \pm 0.1ab	2.1 \pm 0.1a	2.6 \pm 0.1b	14.3 \pm 0.5	13.3 \pm 0.2
Summations or indexes							
Branched carb. chain	4.9 \pm 0.3	4.8 \pm 0.2	14.4 \pm 0.2	15.6 \pm 0.5	15.6 \pm 0.4	3.5 \pm 0.1	4.0 \pm 0.2
Branched FA	0.7 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1**	2.6 \pm 0.1a	3.1 \pm 0.1ab	3.5 \pm 0.2b	1.4 \pm 0.1	1.7 \pm 0.1*
Branched DMA	4.2 \pm 0.2	3.7 \pm 0.2	11.8 \pm 0.2	12.5 \pm 0.5	12.2 \pm 0.4	2.1 \pm 0.1	2.3 \pm 0.1
FA < 1% ^b	1.7 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1*	2.2 \pm 0.1ab	2.6 \pm 0.1a	2.0 \pm 0.2b	1.7 \pm 0.1	1.7 \pm 0.1
DMA < 1% ^c	1.1 \pm 0.0	1.0 \pm 0.1	1.3 \pm 0.0a	1.3 \pm 0.1a	1.1 \pm 0.0b	0.8 \pm 0.0	0.7 \pm 0.0
Saturated carb. chain	31.2 \pm 1.2	32.2 \pm 0.7	48.3 \pm 0.5b	55.3 \pm 1.6a	45.1 \pm 0.5c	30.8 \pm 1.1	28.9 \pm 0.6
Saturated FA	20.5 \pm 1.3	22.7 \pm 0.9	22.7 \pm 0.4b	29.6 \pm 2.3a	21.1 \pm 0.3c	21.8 \pm 1	20.3 \pm 0.8
Saturated DMA	10.6 \pm 0.3	9.5 \pm 0.5	25.7 \pm 0.6	25.7 \pm 1.1	24.0 \pm 0.7	9.0 \pm 0.2	8.7 \pm 0.4
Monounsatur. carb. chain	23.2 \pm 0.6	22.4 \pm 0.9	7.8 \pm 0.1a	7.7 \pm 0.2a	9.6 \pm 0.3b	26.9 \pm 0.8	26.6 \pm 0.2
Monounsatur. FA	10.3 \pm 0.2	12.7 \pm 0.4**	5.1 \pm 0.1a	5.4 \pm 0.2a	6.5 \pm 0.3b	12.6 \pm 0.4	13.3 \pm 0.3
Monounsaturated DMA	12.8 \pm 0.5	9.7 \pm 0.6**	2.7 \pm 0.1b	2.3 \pm 0.1a	3.0 \pm 0.1c	14.3 \pm 0.5	13.3 \pm 0.3
FA dienes (without NMI)	1.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	0.8 \pm 0.0b	1.2 \pm 0.1a	0.5 \pm 0.0c	0.8 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1**
FA trienes (without NMI)	0.6 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0**	0.3 \pm 0.0a	0.5 \pm 0.0b	0.2 \pm 0.0a	0.1 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0
FA tetraenes	4.8 \pm 0.2	5.6 \pm 0.2*	6.8 \pm 0.3a	5.9 \pm 0.3a	9.1 \pm 0.2b	3.3 \pm 0.1	3.6 \pm 0.3
FA pentenes	12.4 \pm 0.5	10.3 \pm 0.4**	10.5 \pm 0.3b	6.9 \pm 0.3a	11.8 \pm 0.2b	10.0 \pm 0.0.6	9.5 \pm 0.4
HUFA^d	31.8 \pm 1	31.9 \pm 1	29.7 \pm 0.5a	23.0 \pm 1b	32.0 \pm 0.5a	25.0 \pm 0.9	25.3 \pm 0.3
n-6 PUFA	7.9 \pm 0.3	8.6 \pm 0.4	9.3 \pm 0.3a	8.6 \pm 0.5a	11.7 \pm 0.1b	4.8 \pm 0.2	6.0 \pm 0.3**

n-3 PUFA	25.4 ± 0.9	24.8 ± 1.2	21.6 ± 0.3a	16.1 ± 0.7b	21.0 ± 0.4a	21.1 ± 0.8	20.8 ± 0.3
NMI	10.9 ± 0.3	10.1 ± 0.4	11.5 ± 0.3ab	10.7 ± 0.7a	12.7 ± 0.3b	15.3 ± 0.6	16.1 ± 0.4
DMA	23.5 ± 0.6	19.2 ± 1**	28.3 ± 0.6	28.0 ± 1.1	27.0 ± 0.7	23.3 ± 0.5	22.0 ± 0.5
Unsaturation index ^e	218.4 ± 5.2	216.2 ± 4.6	188.6 ± 2.1b	153.1 ± 5.7a	199.3 ± 2.2c	193.0 ± 4.6	197.3 ± 1.4
Unsaturation ratio	2.2 ± 0.1	2.1 ± 0.1	1.1 ± 0.0b	0.8 ± 0.0a	1.2 ± 0.0c	2.3 ± 0.1	2.5 ± 0.1
Chain fluidity index ^f	89.6 ± 1.6	87.6 ± 0.8	71.3 ± 0.6b	60.7 ± 2.1a	77.5 ± 0.7c	88.7 ± 1.5	90.9 ± 0.7
Average chain length	19.4 ± 0.1	19.4 ± 0.0	19.0 ± 0.0b	18.6 ± 0.1a	19.3 ± 0.0c	19.1 ± 0.1	19.2 ± 0.1
20-22 carbon chains	64.1 ± 1.1	62.8 ± 0.7	47.6 ± 0.4b	39.3 ± 1.5a	51.8 ± 0.4c	60.0 ± 1.2	60.6 ± 0.7
≤ 16 carb. chains	13.9 ± 1.2	15.0 ± 0.6	16.7 ± 0.3b	21.6 ± 1.8a	13.6 ± 0.2c	12.0 ± 0.8	11.1 ± 0.6

Different letters indicate significant differences ($\alpha = 0.05$) among seasons for *M. mercenaria* (Tukey's post-hoc HSD or Steel-Dwass all-pair comparison), and asterisks indicate significant differences (*: P -value < 0.05; **: P -value < 0.01; Student's t -test or Wilcoxon) between seasons for *S. solidissima* and *A. islandica*. Results are presented as mean ± SEM.

^a Tissues from two individuals were pooled for each replicate.

^b Fatty acids never greater than 1% abundance. This includes 10:0, 16:0iso, 17:0anteiso, 18:0iso, 20:0, 18:3n3, 20:3n6, 21:5n3, NMI 20:2iso, and NMI 20:3.

^c DMA never greater than 1% abundance. This includes 9:0, 15:0, 16:0iso, 18:0anteiso, 18:1, 19:0, 20:0, 20:1iso, and 20:2.

^d Highly unsaturated fatty acids: fatty acids with four or more double bonds.

^e Unsaturation index = $\sum mi \cdot ni$, where mi is the mole percentage and ni the number of double bonds of the carbon chain (FA or DMA) i .

^f Chain fluidity index = $1 * (\% \text{ monounsaturated chains}) + 1.5 * (\% \text{ polyunsaturated chains})$.

Figure 4.2 presents indexes and sums of mol% summarizing changes in membrane lipids from winter to summer for the two cold tolerant species and from autumn to summer for *M. mercenaria*. Significant seasonal effects were found for membrane lipid of all three species, however, while the cold tolerant species presented a pattern consistent with a return from cold induced lipid remodeling from winter to summer, *M. mercenaria* presented the opposite.

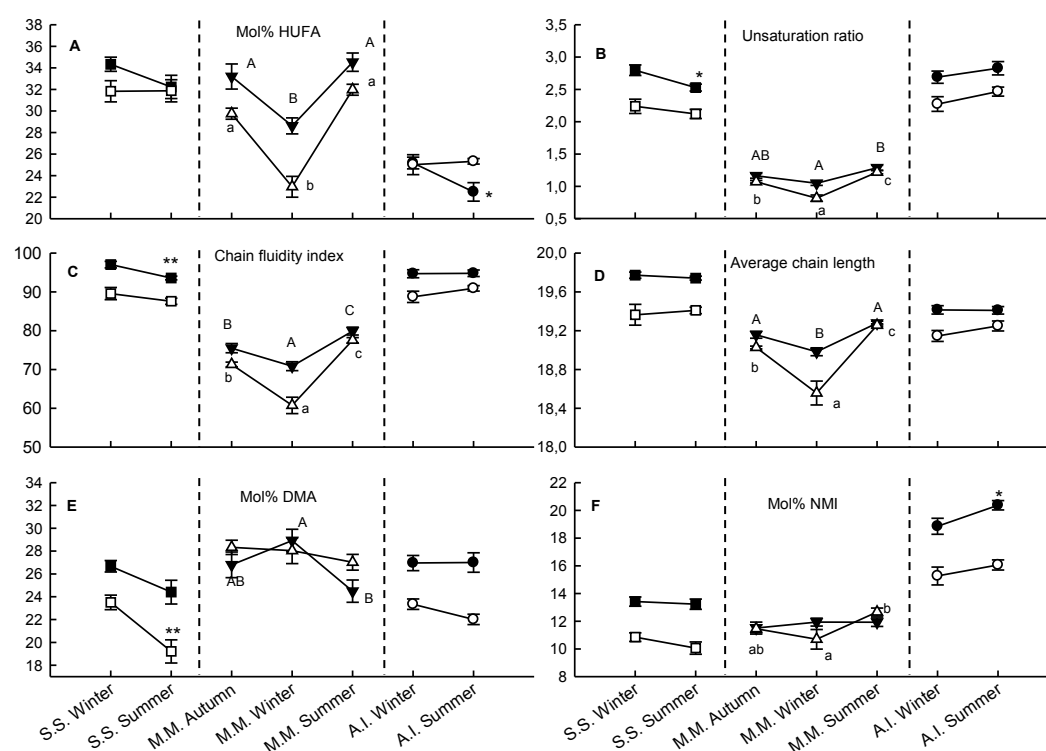


Figure 4.2 Sums and indexes for carbon chain analysis of gill mitochondrial (filled symbols) and non-mitochondrial (open symbols) PL for three marine bivalve species (order Veneroida). Autumn = early December (2°C), winter = early April (2°C), summer = late August (12°C). Significant differences among seasons are denoted by asterisks for *S. solidissima* and *A. islandica* (Student's *t*-test or Wilcoxon; * < 0.05, ** < 0.01), and by upper- (mitochondria) and lower (non-mitochondrial)-cased letters for *M. mercenaria* (Tukey's post-hoc HSD or Steel-Dwass all-pair comparison). Results are means ± SEM.

Whereas the mol% HUFA tended to decreased from winter to summer in the cold tolerant species (significant for *A.i.*; $T_{12} = 2.65$, $P = 0.021$), it decreased over the course of the winter and returned to a higher value for summer in *M. mercenaria* (Fig. 4.2 A). The contribution of carbon chain unsaturation to overall membrane fluidity is often reported by calculating the unsaturation index (see tables 4.2 and 4.3 for equation and results). However, this index overestimates the relative contribution of PUFA of three or more double bonds. The unsaturation ratio (Fig. 4.2 B, total unsaturated chains / total saturated chains) is preferred by some authors, but this index nonetheless neglects the greater contribution of PUFA relative to MUFA. Here we propose the chain fluidity index (CFI), (equation 1; Fig. 4.2 C). This equation reflect the contribution of carbon chains composition on overall membrane fluidity. It is based on empirically found relative contribution of each each class of FA (Coolbear et al. 1983). Despite that carbon chain class composition have a major influence on overall membrane fluidity, this equation does not take into account the additional effect of other membrane lipid characteristics such as proportion of PL polar head group, plasmalogens, position of double bonds on the carbon chain, presence of branched chains, and cholesterol content.

$$CFI = \sum(1 \times \% \text{monounsaturat. chains}) + (1.5 \times \% \text{polyunsaturat. chains}) \quad (1)$$

The CFI significantly decreased in mitochondria of *S. solidissima* from winter to summer ($T_{11} = 3.55$, $P = 0.004$); whereas no changes occurred for *A. islandica*. Again, the pattern was opposite to expectations of a return from cold-induced lipid remodelling in *M. mercenaria* i.e. the CFI decreased from autumn to winter and returned to even higher values in summer. Because most PUFA and especially HUFA have long chain length, the overall contribution to membrane fluidity conferred by their double bonds should be partly counteracted by the concomitant increase in average chain length. This is because increasing FA chain length in a membrane increases its bilayer thickness and viscosity. While average chain length did not

change between season for the two cold-active species, the values were lower during winter for both biological fractions in *M. mercenaria*, mostly as a result of the lower abundance of long-chain HUFA (mitochondria: $F_{2,22} = 19.27$, $P < 0.001$; non-mitochondrial: $\chi^2 = 20.48$, $P < 0.001$; Fig. 4.2 D).

The percent DMA among carbon chains (and therefore % plasmalogens among PL) was generally higher during winter than summer, with the differences being significant for *S. solidissima* non-mitochondrial membranes ($T_{12} = 3.59$, $P = 0.004$) and *M. mercenaria*, mitochondria ($F_{2,22} = 4.67$, $P = 0.015$; Fig. 4.2 E). NMI FA have been evidenced to confer greater membrane fluidity than regular methylene interrupted FA of the same number of double bonds (Zakhartsev et al. 1998). However, we found lower levels of NMI in winter than in summer for *A. islandica* mitochondria ($T_{12} = -2.28$, $P = 0.041$), as well as for *M. mercenaria* non-mitochondrial membranes ($F_{2,21} = 4.45$, $P = 0.024$, post-hoc $P = 0.019$; Fig. 4.2 F).

4.6 Discussion

4.6.1 FA remodelling during quiescence in *M. mercenaria*

This study aimed at investigating if a cold induced (FA based) lipid remodeling occurs during quiescence in *M. mercenaria*. Sampling individuals of this species kept between 2 and 12°C over the course of the year did not reveal signs of lipid remodeling in the expected direction for a winter active ectotherm. The CFI and/or HUFA were not higher during autumn (2°C) than during summer (12°C), and they were even lower at the end of winter (2°C) when maximal acclimation to low temperature should have been reached. This contrasts with the results found for the two sympatric and evolutionarily related (veneroid) cold tolerant species. Individuals of these control species presented signs of lipid remodeling in the expected direction at the level of the mitochondrial membrane in each case i.e. *S. solidissima* had higher

CFI, and *A. islandica* had higher levels of HUFA during winter than during summer. Hence we conclude that the bivalves were kept in proper housing conditions to express cold induced lipid remodeling, and that its absence in *M. mercenaria* is a specific response of the species for the range of temperature considered.

Our observations are based on a complete membrane carbon chain analysis. The HVA theory was developed on species that do not possess important proportions of plasmalogens, NMI or branched lipids (e.g. fish and other vertebrates), and these secondary lipids were seldom considered later. In the case of *M. mercenaria*, they are particularly abundant, collectively accounting for ca 41% of the total carbon chains present in gill membranes PL (Table 4.2 and 4.3), and should thus have a major influence on physical properties of the membranes. We included these carbon chains in our analysis and observed minor changes in their proportion among seasons for some biological fraction/species (Fig. 4.2 E, F). Nonetheless, these carbon chains were included in the calculation of the CFI and mol% of HUFA, hence the main conclusion that *M. mercenaria* do not perform cold induce lipid remodeling in the expected direction after entrance into quiescence remains unchanged.

The absence of lipid remodelling at cold temperature in *M. mercenaria* was suggested by previous studies. Parent et al. (2008) have shown that adults increase gills PL mol% HUFA (DHA and EPA) in response to a decrease in temperature from 22 to 0°C. However, most of the increase occurred from 20 to 8°C during autumn, whereas few changes occurred thereafter when temperatures declined from 8 to 0°C. Previously, Gillis & Ballantyne (1999) found no evidence of changes in the ratio of stabilizing (PC + PI) to destabilizing (PE + PS) PL, and no changes in general FA composition (except for a decrease in 22:4n6 in winter) in gill mitochondrial membranes of adults *M. mercenaria* exposed to a decrease from 12 to -1°C. This is meaningful as mitochondrial membrane are generally known to respond to a greater extent to cold than other cell membranes (Hazel & Williams 1990), and the study of

Gillis and Ballantyne (1999) should have detected important changes if they were to occur in the range of temperature considered. Here we ascertain that this quasi absence of cold induced lipid remodelling in *M. mercenaria* coincided with quiescence (and cold stress) as previously reported (Bricelj et al. 2006). Valves were maintained closed during autumn and winter in this species while the two cold-active species continued filter-feeding. Measuring lipoxidation markers in gills of *M. mercenaria* confirms higher physiological stress during the cold season (autumn and winter), and not as a result of heat as commonly observed for temperate bivalves (Abele et al. 2002). This is in line with previous observations of physiological stress during exposure to cold. Juvenile mortality is known to occurs during winter in this species, and cold shock experiments (a drop from 12 to 1 °C in 3 h) recruits higher expression of HSP70 and HSP40 chaperones than the corresponding heat shock (a rise from 1 to 12 °C in 3 h; Bricelj et al. 2006). When considered with respect to previous studies, our results suggest that lipid remodeling in *M. mercenaria* ceases below a temperature threshold that also elicit quiescence and physiological stress in this species.

Coordination between the level of activity of the whole organism and the pace of membrane bound processes through the modulation of lipid remodeling may benefit ectotherms. Winter dormant freshwater planktonic crustacean species, do not perform lipid remodeling (Farkas 1979; Farkas et al. 1982). Further, if HUFA in crayfish membranes were seen to increase in both a winter active and a winter quiescent species, only the winter active species presented changes in PL polar head group (Pruitt 1988). These studies provide the first indication that winter dormant species restrain lipid remodeling. It is not known, however, if the control is independently triggered by a change in temperature or if it is a flexible response coordinated with the level of activity of the whole organism. Here we found that *M. mercenaria* ceases remodeling membrane lipids when the decrease in temperature occurs from just above to below the threshold known to elicit quiescence in this species. This suggests

a flexible and fine coordination, contrasting with one of the suggested mechanisms for the HVA whereby an increase in mRNA transcripts for the Δ^9 -desaturase permits the conversion of SFA into MUFA as a simple gradual and blind response to cold (reviewed in Hazel & Williams 1990; Hochachka & Somero 2002). A fine coordination between membrane bound processes and whole organism activity in *M. mercenaria* could benefit northernmost populations facultatively expressing quiescence in response to variable winter temperature.

We must acknowledge however that the absence of higher levels of HUFA in autumn compared to summer in *M. mercenaria* could be explained by passive mechanisms. HUFA are essential FA in bivalves, as such they must be acquired from the diet which is impossible when individuals cease filter-feeding below the threshold of 6-7°C. In mammals, the acyltransferase-driven exchanges of HUFA between triglycerides and membrane phospholipids could compensate when assimilation of new FA is temporarily stopped. Such exchanges are unlikely for *M. mercenaria*; Pernet et al. (2006) only found triglycerides reserves to represent $\leq 0.5\%$ of all lipids in juvenile *M. mercenaria*, which cast a strong doubt about large availability in adults. Furthermore, the pattern of HUFA changes among seasons that we found for individuals of *M. mercenaria* was not limited to the absence of an increase between summer and autumn, it also includes a decrease between autumn and the end of winter. This was unexpected, but may be explained by the higher lipoxidation sustained by individuals of this species during autumn, and to a lesser extent during winter (Fig. 4.1). HUFA are much more prone to lipid peroxidation than other FA (Holman 1954; Hulbert et al. 2007); increased lipoxidation rates coinciding with arrested filter-feeding activity during winter in *M. mercenaria* may result in a specific gradual loss of these FA from membranes PL.

Passive mechanisms cannot explain the absence of evidence for HVA in *M. mercenaria*. Increasing membrane fluidity only requires elevating the ratio of

monoenoic and/or dienoic FA to SFA (Coolbear et al. 1983). In the case of bivalves, membrane fluidity may alternatively be increased by elevating the proportion of NMI which can be synthesized de novo (Zhukova 1991). This second mechanisms has been suggested to account for an important part of bivalve putative HVA (Barnathan 2009) as the fluidizing effect of NMI on membrane has been found greater than that of any other PUFA (Zakhartsev et al. 1998). However, despite the fact that both these mechanisms are independent of new FA acquisition through filter-feeding, the CFI was found to be significantly lower during winter in both types of membranes of *M. mercenaria* (Fig. 4.2 F). This indicates that the contribution to membrane fluidity conferred by the observed changes in FA was to lower fluidity during winter and not to increase it. For this reason, we conclude that *M. mercenaria* individuals do not resort to membrane fluidity increasing—FA remodeling when the temperature decreases below the threshold eliciting quiescence i.e. they abandon HVA.

4.6.2 HVA or HUFA increase?

Whether HVA or increase in HUFA is the key mechanism allowing adaptation of membranes to cold is disputable and has not always been distinguished in past studies. Here we present the first investigation of the effects of cold on membrane lipids in *S. solidissima* and *A. islandica*, providing further results to help make this distinction. Whilst we found that both species presented at least a trend for higher HUFA during winter (the difference was significant for *A. islandica*), only *S. solidissima* was found to increase CFI (sign of HVA). In accordance an increase in PL HUFA in response to cold is generalized in bivalves species investigated so far (Hall et al. 2002)(Pernet et al. 2007)(Parent et al. 2008). In contrast, only Hall et al. (2002) working with *Placopecten magellanicus* actually measured membrane fluidity *per se* (use of the 5-doxyl stearic acid probe in combination of electron spin resonance measurements on reconstituted vesicles), and observed an actual increase in response to cold. This increase was however limited to a 14% HVA efficacy i.e. 14% of compensation for the loss of fluidity between both temperatures. This raises

the question if an overall increase in membrane fluidity, as suggested by the HVA theory, is not of secondary importance in bivalves. Choosing to specifically increase HUFA for the sole purpose of increasing the bulk membrane physical properties is not efficient. Conversion of SFA to MUFA is much less energetically expensive, much more rapid, does not require assimilation of essential PUFA, and will not interfere with the cell signaling role of some derivative of HUFA such as eicosanoids. However, we found that monounsaturated carbon chains (FA + DMA) were not higher during winter than summer in mitochondria of our cold tolerant species (Table 4.2). Furthermore, the significantly higher value of HUFA during winter in mitochondria of *A. islandica* was not echoed by an increase in CFI which more adequately represents the overall contribution of FA on membrane fluidity. We are thus left to conclude that if any HVA occurred in our cold tolerant species, this was not conveyed through changes in PL FA.

The HVA theory has been developed before it was known that HUFA have a direct and irreplaceable modulating effect on integral enzymes (Turner et al. 2003; Grossfield et al. 2006) that has the potential to play a key role in maintaining activity during cold. HUFA are also strongly associated with cardiolipin in bivalves (Kraffe et al. 2002; Kraffe et al. 2005; Kraffe et al. 2008), a PL known to interact specifically with mitochondrial integral enzymes to modulate their activity (Chicco & Sparagna 2007). Changes in the proportion and HUFA composition of CL may thus play a major role of maintaining integral enzyme activity during exposure to cold in bivalves. Future studies should investigate if a genuine increase in membrane fluidity is a generalized and important (% of HVA efficacy) response to cold in bivalves or if it is not solely a secondary consequence of the increase in HUFA that aims at ensuring cold acclimation through specific lipid-protein interactions.

4.7 Acknowledgements

We are grateful to the following people: Dr Richard St-Louis (UQAR), Dr Edouard Kraffe (UBO), and Diane Bérubé (UQAR) for help in developing the lipid analysis method; Dr Madeleine Nadeau (MERINOV) for seawater temperature data from the Îles-de-la-Madeleine; and Rachel Rioux-Paré and Véronique Desrosiers for help with lipid analyses. Special thanks are extended to Dr. Jim Ballantynes for valuable comments on the discussion. Daniel Munro was supported by scholarship grants from NSERC and the FONCER programme from the Réseau Aquaculture Québec. This project was supported by an NSERC Discovery grant to Pierre U. Blier.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'implication des radicaux libres (et plus tard des ERO en général) dans la progression de la sénescence a commencé à être étudiée avec Harman (1956). Un demi-siècle plus tard, les évidences provenant des études comparatives semblent contradictoires entre elles lorsqu'elles sont analysées dans le cadre de la théorie générale du vieillissement par le stress oxydant. Les défenses antioxydantes sont inversement reliées à la longévité et leur augmentation par voie expérimentale ne prolonge pas la durée de vie. La relation entre le taux de production des ERO d'origine mitochondriale et la longévité souffre de plusieurs lacunes expérimentales et ne produit pas de résultats clairs. La relation entre les mécanismes de réparation des dommages oxydatifs et la longévité n'est pas bien établie encore. Par contre, la susceptibilité à l'oxydation des lipides structuraux des membranes biologiques est clairement inversement associée à la longévité chez les vertébrés. Les études expérimentales sur les effets de l'accumulation de mutations à l'ADNmt ont par contre redirigé le domaine de la recherche d'une façon qui permettrait maintenant de réconcilier ces études comparatives. La manipulation génétique de la polymérase gamma (création de la PolGD257) altérée au niveau de sa séquence de reconnaissance (chez la souris) est venue donner un fort appui à l'idée selon laquelle l'ADNmt serait la première cible des ERO en importance. En effet, les lignées de souris produites sont identiques à l'exception d'un taux d'accumulation de mutations à l'ADNmt plus élevé. Elles sont caractérisées par l'apparition précoce des signes de vieillissement à l'échelle macroscopique et cellulaire qui sont très fidèles à ceux observés chez leurs consœurs plus âgées (Trifunovic et al. 2004; Kujoth et al. 2005; Hiona et al. 2010). Il semble donc que les processus d'oxydation puissent en effet être

impliqués dans le vieillissement comme il était proposé, mais d'abord et avant tout par l'entremise de l'oxydation de l'ADNmt qui provoque l'accumulation de mutations.

Si la sénescence progressait principalement par l'accumulation de mutations à l'ADNmt, une diminution du flux d'ERO à son endroit devient théoriquement un des mécanismes les plus efficaces à prolonger la durée de vie. La décroissance de la force des défenses antioxydantes cytosoliques avec l'augmentation de la durée de vie s'expliquerait maintenant par une diminution du besoin de protéger le compartiment cytosolique chez les espèces de grande longévité. En effet, la dispersion d'ERO (primaires et secondaires) de la mitochondrie vers le cytosol serait moindre pour ces espèces. Certains auteurs distinguent la nuance apportée par ce raffinement de la théorie générale par l'expression de « théorie du vieillissement par le stress oxydant *mitochondrial* », où la source et la cible des ERO sont extrêmement proches l'une de l'autre. Dans ce contexte, les modulateurs de la vitesse de sénescence deviennent les sources d'ERO à proximité de l'ADNmt. Aussi, les ERO primaires produits par le STE et les réactions enzymatiques proximales s'ajoutent aux ERO secondaires (aldéhydes réactifs) issus de la peroxydation lipidique de la membrane interne pour former le flux total d'ERO vers l'ADNmt. Ceci puisque les deux types d'ERO ont un potentiel mutagène démontré. Ainsi la diminution de l'une ou l'autre de ces facettes de la production d'ERO totale (ou les deux ensemble) pourrait moduler la longévité. Ce cadre théorique très réconciliateur, et donc puissant, demande toutefois à ce que les études comparatives appuient l'idée d'une diminution des ERO totaux vers l'ADNmt. Il est donc plus important que jamais à ce point de poursuivre la recherche sur les relations inverses ERO-longévité et IP-longévité.

Ce travail de doctorat se positionne comme une tentative de valider ces relations d'une façon nouvelle, en tirant avantage du modèle de vieillissement des bivalves marins de grande longévité. Le travail cherche à démontrer l'existence de la relation

ERO-longévité en évitant les failles majeures des études passées. Il s'agit en quelques sortes d'engager à nouveau la discussion sur cette hypothèse qui offre tant de possibilités de réconciliation à un moment où les biogérontologistes commencent à lui tourner le dos. En ce qui concerne la relation inverse IP-longévité, ce travail se positionne comme une évaluation de la généralisation de la relation dans le règne animal. Plus important encore, la thèse évalue la force évolutive présente pour maintenir la relation envers plusieurs facteurs connus pour avoir une influence sur la composition des lipides membranaires chez les organismes étudiés. En ce sens, ce doctorat se trouve à sortir la relation des limites très restreintes à l'intérieur desquelles elle était préalablement confinée et qui étaient ignorées dans la foulée de l'uniformité des résultats positifs chez les vertébrés.

Les résultats de ce travail, obtenus pour l'une et l'autre des relations inverses, s'inscrivent comme un appui fort à l'hypothèse réconciliatrice du vieillissement par le stress oxydant mitochondriale. En effet, non seulement les relations sont trouvées dans les deux cas, mais dans le cas de l'étude des membranes, la membrane mitochondriale semble sous pression évolutive plus prononcée que les autres membranes pour une diminution de la peroxydation lipidique chez les espèces de plus grande longévité. Les sections suivantes explorent les forces et faiblesses de cette démonstration et leur portée théorique. Une section spéciale discute aussi du chapitre IV sur le remodelage lipidique durant la quiescence chez *M. mercenaria*. Bien que ce chapitre repose sur des méthodes analytiques similaires à celles utilisées aux chapitres II et III, et que les résultats aient des implications sur les conclusions du chapitre II, il s'agit néanmoins d'un objet de recherche distinct. Une section perspective explore ensuite les possibilités d'amélioration de ces domaines de recherche ainsi que des possibilités nouvelles pour poursuivre dans la démonstration de la théorie du vieillissement par le stress oxydant mitochondrial par l'approche comparative.

La relation inverse ERO-longévité

À l'origine de ce travail, l'hypothèse avait été émise selon laquelle la relation inverse ERO-longévité serait présente dans toutes les lignées animales où le phénotype de la sénescence est observé. Les résultats du chapitre I vont dans ce sens en montrant clairement la relation chez les bivalves marins Hétérodontes. Il s'agit possiblement de la première démonstration forte d'une telle relation hors du groupe des vertébrés. Certaines études pionnières sur la relation inverse ERO-longévité avaient obtenu des résultats positifs en comparant des espèces d'insectes (diptères) (Sohal et al. 1990; Sohal et al. 1995). Par contre, seule la condition non physiologique de passage inverse des électrons (PIE) a été testée et les résultats n'ont pas été ajustés pour les grandes divergences de taille corporelle entre ces espèces. Dans le chapitre I, les conditions de passage avant des électrons (PAE) et même de convergence des électrons (CE) sont incluses pour s'assurer que les résultats ne sont pas un artéfact des conditions *in vivo* utilisées.

Un aspect important de cette contribution est que les valeurs sont normalisées par l'activité de la citrate synthase ainsi que par celle du complexe IV. Les études précédentes de ce domaine ont uniformément utilisé une normalisation par mg de protéines dites « mitochondriales ». Il s'agit d'un dosage de protéines fait sur la fraction collectée sous forme de culot par les méthodes habituelles de centrifugation différentielle reconnues pour concentrer les mitochondries. Cette norme de standardisation est simple et rapide, mais pose certains problèmes de fond. Les espèces de plus grande longévité sont généralement caractérisées par un métabolisme basal plus lent (Hulbert 2008). Il n'a jamais été démontré que ce plus faible métabolisme de base (et maximal) n'était pas tout naturellement associé à un moindre volume mitochondrial cellulaire. En effet, il n'y actuellement pas d'études de fond sur les relations entre la densité mitochondriale cellulaire et la taille, la longévité et le taux métabolique des animaux. Cette étape de la recherche pourrait avoir été omise par manque d'engouement pour des questions jugées trop simplistes, bien

qu'importantes. Pourtant, s'il devait y avoir une relation inverse entre la longévité et la densité mitochondriale cela pourrait faire problème. Les méthodes de centrifugation différentielle devraient récupérer une proportion relativement plus élevée de protéines non mitochondriales dans le culot enrichi en mitochondrie dans le cas des espèces de plus grande longévité si elles sont caractérisées par une moindre densité mitochondriale. Ceci augmenterait la valeur du dénominateur lors d'une normalisation par mg de protéines. Ainsi, toutes autres choses étant égales, le résultat présenté en terme d'ERO/mg de protéines serait plus faible pour les espèces de plus grande longévité pour une simple question de biais expérimental.

Même si le culot enrichi en mitochondries ne contenait pas d'autres fragments cellulaires, ce qui est peu probable, le même type de biais expérimental pourrait être présent à l'intérieur même de la mitochondrie. Le plus faible métabolisme chez les espèces de grande longévité pourrait être associé à une plus faible proportion des protéines mitochondriales impliquées dans les voies de la phosphorylation oxydative relativement à celles impliquées dans les autres fonctions métaboliques assumées par les mitochondries (e.g. plus faible densité de cristae). Dans ce cas, la moindre production d'ERO par mg de protéines serait simplement le reflet d'une moindre capacité de phosphorylation oxydative des mitochondries. Encore une fois les études de fond sur les relations allométriques et les relations avec l'âge pour la densité de cristae et les capacités de phosphorylation oxydatives sont manquantes. Il n'est donc pas possible d'éliminer la possibilité selon laquelle une grande part des résultats positifs dans ce domaine de recherche ne soient qu'un artéfact du manque de connaissances fondamentales et de l'utilisation de techniques rapides.

Pour pallier ce problème, le chapitre I utilise deux marqueurs mitochondriaux complémentaires. La citrate synthase est le second meilleur marqueur du volume mitochondrial tel que mesuré par microscopie électronique (Larsen et al. 2012). La cytochrome *c* oxydase est le meilleur marqueur des capacités de phosphorylation

oxydative (Hulbert, Turner, et al. 2006). La normalisation par la citrate synthase dans le chapitre I a révélé une plus grande production d'ERO chez l'espèce de plus courte longévité (*M. arenaria*) que chez *A. islandica* dans toutes les conditions de substrat et d'inhibiteur testées. La comparaison avec *S. solidissima* (LMR = 37 ans) va dans le même sens à l'exception du stade 2 alimenté par le succinate, une condition de très faible pertinence physiologique. Dans le cas de la normalisation par cytochrome *c* oxydase, la production d'ERO a été plus élevée chez *M. arenaria* que chez *A. islandica* dans toutes les conditions de métabolisme testées. Ces résultats établissent donc dans un premier temps la relation inverse ERO-longévité chez les bivalves comme mentionné dans la discussion du chapitre I. Par contre, pour les raisons mentionnées plus haut, ces résultats établissent de plus que la moindre production d'ERO par les mitochondries d'*A. islandica* n'est ni le reflet d'une moindre densité mitochondriale cellulaire ni celui de moindres capacités de phosphorylation oxydatives. Il s'agit donc d'une validation techniquement robuste de la relation ERO-longévité susceptible d'alimenter fortement le débat à un moment où l'existence de cette relation est remise en question.

Concernant la possibilité d'artéfact mentionnée plus tôt, il faut toutefois reconnaître que plusieurs études avaient néanmoins normalisé les données de production d'ERO par taux de consommation d'oxygène (Free radical leak ou FRL). Lorsque le stade 3 est utilisé pour cette approche, la possibilité d'artéfact est éliminée. La production d'ERO est alors normalisée par les capacités de phosphorylation oxydative. Toutefois, lorsque le stade 2 est utilisé à cette fin, la consommation d'oxygène ne reflète pas les capacités de phosphorylation oxydatives. Elle reflète plutôt le retour libre des électrons à travers la membrane interne par différentes routes telles que les adénosines translocases, les protéines découplantes et la membrane interne directement en fonction de sa porosité intrinsèque. Cette approche, souvent utilisée, est donc bien moins fidèle à l'idée d'une normalisation par capacité de phosphorylation oxydative. Au chapitre I, la mesure de la consommation d'oxygène

par respirométrie haute résolution (Oroboros) permet les calculs de stade 2 et 3. La production d'ÉRO ainsi normalisée selon le principe du FRL était moindre pour *A. islandica* que pour *M. arenaria* autant dans le stade 2 que dans le stade 3. Comparée à *S. solidissima*, la production était moindre pour *A. islandica* en stade 3, mais pas en stade 2. Dans l'ensemble, ces résultats établissent directement que la moindre production d'ÉRO chez *A. islandica* n'est pas le fait d'une moindre capacité de consommation d'oxygène par la machinerie de phosphorylation oxydative. Il s'agit en somme d'une troisième approche de normalisation dont les résultats sont en accord avec ceux obtenus par l'utilisation de la citrate synthase et de la cytochrome *c* oxydase. Le chapitre I représente donc un appui solide à l'existence de la relation inverse ERO-longévité au-delà de l'artéfact mentionné.

L'association inverse ERO-longévité chez *A. islandica* est maintenant bien établie. Nos résultats s'accordent avec une étude préliminaire comparant *A. islandica* et *M. arenaria*, non soumise à un processus de révision par les pairs, mais dont les résultats sont présentés dans Buttemer et al. (2010a). Il faut toutefois noter que cette étude préliminaire utilisait la condition de succinate-roténone qui limite la production des ERO au niveau du complexe III plutôt que d'intégrer la production de tous les sites du STE.

Ensemble ces études présentent toutefois une faiblesse, une seule espèce de grande longévité a été utilisée bien qu'elle ait été contrastée à deux de courtes longévités. L'utilisation d'un plus grand nombre d'espèces de grande longévité pour étudier la relation inverse ERO-longévité aurait été souhaitable. Les chances de trouver une différence dans la direction attendue par simple hasard décroissent très rapidement pour des comparaisons de deux à cinq espèces et sont très fortes dans le cas de la comparaison entre deux espèces (Garland & Adolph 1994). Ces considérations sont particulièrement importantes à la vue de la faible taille d'échantillons pour *S.*

solidissima. Il y a donc amplement place à des études supplémentaires avant de tirer une conclusion définitive sur l'existence de la relation au sein des bivalves.

Chez *A. islandica*, toutefois, les études supportent bien la relation inverse ERO-longévité. L'utilisation des bivalves comme modèle de longévité gagne actuellement en intérêt auprès des biogérontologistes. L'uniformité des résultats positifs chez l'espèce animale (métazoaire) ayant la plus grande longévité ne permet plus à ce point d'écarter la possibilité d'une relation inverse ERO-longévité. Le débat sur l'existence de cette relation n'est donc pas fini. Au contraire, un regain d'intérêt alimenté par *A. islandica* pourrait bien mener à une réévaluation de la relation chez les invertébrés. Plus précisément, cela pourrait mener à l'idée que la démonstration de la relation demande l'utilisation de modèles forts. Le bilan retenue par les biogérontologistes pourrait être que la relation ne s'observe que dans le cas où il existe un grand facteur de différence de longévité et que les corrections statistiques pour la taille et l'origine évolutive peuvent être évitées. Dans tous les cas, la relation inverse ERO-longévité est fascinante par nature et représente plus que jamais une avenue de réconciliation entre les résultats des études comparatives et l'hypothèse du vieillissement par le stress oxydant mitochondrial. Aussi, cette avenue de recherche ne saurait connaître une fin dans l'immédiat.

La relation inverse IP-longévité

À l'origine de ce travail, l'hypothèse avait été émise selon laquelle la relation inverse IP-longévité serait présente dans toutes les lignées évolutives animales où la sénescence est observée. Les résultats du chapitre II vont dans ce sens en montrant clairement la relation dans le modèle des bivalves marins Hétérodontes. Chez les invertébrés, l'implication des lipides membranaires comme modulateur de la longévité avait été suggérée par comparaison intraspécifique. Les reines de l'abeille à miel (*Apis mellifera*) peuvent vivre jusqu'à 5-8 ans tandis que les travailleuses vivent

de 75 à 135 jours. Les deux catégories d'abeilles partagent le même génome, mais les reines ont un IP trois fois plus faible grâce à la substitution des AGPI par des AGMI tels que l'acide oléique 18:1n9 (Haddad et al. 2007). Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, des lignées mutantes à longévité prolongée sont également caractérisées par un plus faible IP (Reis et al. 2011; Hulbert 2011). On pourrait critiquer que les reines et les travailleuses sont difficilement comparables chez les abeilles à miel et que les lignées mutantes ne représentent pas le résultat de l'évolution par la sélection naturelle chez *Caenorhabditis elegans*. Néanmoins, ces études ont présenté les premières évidences d'une association entre la longévité et la composition lipidique des membranes pour des invertébrés.

L'étude du chapitre II représente quant à elle la première contribution à la démonstration d'une relation inverse IP-longévité par comparaison interspécifique chez les invertébrés avec un modèle multispécifique. Cet apport est très significatif compte tenu de la diversité (>95%) et de l'abondance (>99%) des espèces de cette division du règne animal. Il est significatif aussi étant donné que la physiologie des endothermes est très conservée ce qui limite les capacités d'inférence. La température corporelle constante, la très simple biochimie des lipides, la régulation fine de la PO_2 par le contrôle de la ventilation et de la circulation sanguine et la meilleure séparation entre le milieu extérieur et le milieu intérieur sont autant de facteurs caractérisant les vertébrés homéothermes généralement utilisés jusqu'à maintenant. Il était donc nécessaire d'incorporer des comparaisons chez les invertébrés pour éviter la critique selon laquelle l'ajustement de la composition lipidique membranaire n'est qu'un luxe des homéothermes. En effet, l'existence de la relation chez les homéothermes ne pourrait être qu'un raffinement physiologique caractéristique des espèces de plus grande longévité rendu possible par la physiologie très conservée. Avant sa démonstration chez les invertébrés, l'importance de cette relation en tant que modulateur de la longévité pouvait donc encore être considérée comme très secondaire.

Les bivalves doivent faire face à des contraintes physiologiques supplémentaires soupçonnées de, ou reconnues pour, influencer la composition lipidique membranaire. Ainsi, l'évolution pour l'ajustement aux conditions physiques de température, pression hydrostatique, salinité et de pression partielle d'oxygène toutes spécifiques à la niche écologique de chaque espèce est susceptible d'effacer la relation inverse IP-longévité. Le modèle biogérontologique des bivalves hétérodontes représente en quelque sorte une opportunité de démontrer l'importance relative de l'ajustement de l'IP pour l'augmentation de longévité par rapport à son ajustement pour différentes contraintes physiologiques liées à l'environnement. Par exemple, *M. arenaria* et *M. mercenaria* doivent s'adapter aux conditions intertidales (variations de température et pression partielle d'oxygène quotidiennes), *M. mercenaria* doit s'adapter aux conditions estuariennes (variations annuelles de salinité) et *A. islandica* utilise la dépression métabolique intermittente (variation de pression partielle d'oxygène).

Les résultats du chapitre III montrent une relative indépendance de la relation inverse IP-longévité sur ces facteurs confondants. Ces résultats sont donc en accord avec la possibilité d'une implication indispensable de l'ajustement des lipides membranaires pour l'augmentation de la longévité. Mais plus encore, l'analyse plus fine de la réalité biologique de ces espèces de bivalves montre qu'elles ne sont pas seulement soumises à des facteurs confondants additionnels par rapport aux homéothermes. Leur réalité écophysiologique est plutôt qu'elles se distribuent dans des habitats de façon telle que la stabilité de l'environnement augmente avec l'augmentation de la longévité. Une augmentation de la stabilité de l'environnement diminue la fréquence et la force des épisodes de stress physiologique susceptibles d'engendrer la peroxydation lipidique. Ainsi, *A. islandica* est retrouvée jusqu'à 300 m de profondeur où les changements de conditions sont quasi inexistantes alors que *M. arenaria* et *S. solidissima* sont sujettes à des variations de température quotidiennes et annuelles importantes. En regard de cet aspect, il pourrait être attendu que l'évolution d'*A.*

islandica se soit assouplie vers une composition lipidique plus susceptible à la peroxydation que dans le cas de *M. arenaria* ou *S. solidissima*. Pour cette raison, le fait que l'IP diminue avec, et non pas en sens inverse, de ce gradient de stabilité est un très fort appui à l'idée que la composition lipidique membranaire soit fortement associée à la longévité avant toute autre chose. Ceci suggère une prépondérance des mécanismes internes non affectés par l'instabilité de l'environnement.

Les mécanismes proposés par l'hypothèse du vieillissement par le stress oxydant mitochondrial sont en accord avec cette vision. La peroxydation lipidique à proximité de l'ADNmt (membrane interne) est un processus continu. Bien que ce processus puisse être exacerbé par les épisodes de stress oxydants tels que l'exposition à des températures élevées (Abele et al. 2002), l'importance du taux de base de ce processus devrait l'emporter sur celui des événements ponctuels dans la détermination de la longévité. Ceci pour les considérations topologiques à la base de la théorie. Un stress oxydant est habituellement défini comme un événement plus ou moins temporaire (sinon il devrait mener l'organisme à sa perte) pendant lequel les défenses antioxydantes sont débordées par les mécanismes pro-oxydants tel que la génération des ERO par le STE. Ces événements sont susceptibles de représenter une composante majeure de la dégradation oxydative accumulée pour les composantes cellulaires éloignées des mitochondries et normalement protégées par les défenses antioxydantes cellulaires. Pour ces composantes, le taux de base de production des ERO ne serait qu'une contribution très secondaire à l'accumulation de dommages oxydatifs au cours de la vie de l'organisme. Pour l'ADNmt, les taux de base d'ERO n'étant que partiellement neutralisés puisque produits en contact direct, ils devraient représenter une composante beaucoup plus importante des dommages oxydatifs accumulés au cours de la vie. Bien que les taux d'ERO secondaires découlant de la peroxydation lipidique puissent augmenter largement en condition dite de stress oxydant, ces augmentations étant ponctuelles elles ne devraient pas représenter une proportion aussi importante des dommages oxydatifs accumulés sur l'ensemble de la

vie de l'organisme. Ainsi, le potentiel des membranes mitochondriales à produire les ERO secondaires devrait-il être d'abord être en lien avec la longévité et non en lien avec la fréquence des événements ponctuels de stress physiologiques.

Ce cadre théorique, celui de l'hypothèse du vieillissement par le stress oxydant mitochondrial, est proposé depuis plusieurs années par le groupe Barja/Pamplona (Barja 2013). Nous proposons que la complexité des nuances qu'il comporte représente un obstacle à son intégration par un plus grand nombre de groupes de recherche. Pourtant, bien qu'il soit encore quelque peu spéculatif, ce cadre théorique comporte un potentiel de réconciliation entre les études comparatives et expérimentales dont les apparentes contradictions alimentent la suspicion envers le cadre théorique général de « la théorie du vieillissement par le stress oxydant mitochondrial ». Les résultats des chapitres II et III représentent donc un appui théorique très fort à l'idée d'une relation IP-longévité, mais aussi aux nuances de l'hypothèse du vieillissement par le stress oxydant mitochondrial. Ils sont loin de n'être qu'une démonstration de la relation inverse IP-longévité chez une espèce de plus. Ils établissent la relation chez les invertébrés, valident la persistance de la relation face à des facteurs confondants supplémentaires et un gradient de stabilité écologique qui devraient aller à l'encontre de la relation, et valident la relation chez le métazoaire de plus grande longévité connu.

Le chapitre II était aussi basé sur l'hypothèse secondaire selon laquelle la pression de sélection pour la décroissance de l'IP chez les espèces longévives serait plus forte pour la membrane mitochondriale que pour les autres membranes. Les résultats de ce chapitre vont dans ce sens. L'IP décroît respectivement de façon linéaire et exponentielle pour les membranes non mitochondriales et mitochondriales. En d'autres termes, la relation est plus prononcée pour la membrane mitochondriale. Cette différence entre les deux membranes peut être interprétée de deux façons. Une première explication appuierait encore davantage la théorie du vieillissement par le

stress oxydant *mitochondriale*. La plus forte relation trouvée pour la membrane mitochondriale serait le reflet d'une plus forte nécessité de diminuer la production d'aldéhydes réactifs à proximité de l'ADNmt qu'à proximité des autres membranes cellulaires pour l'accroissement de la longévité. Cette explication met l'accent sur le rôle des membranes en tant que producteur d'ERO secondaires. La deuxième explication met l'accent sur l'aspect cible des membranes. La plus forte relation inverse IP-longévité pour la membrane mitochondriale tiendrait à une plus grande importance évolutive du maintien de la fonctionnalité de cette membrane pour l'accroissement de la longévité. La membrane mitochondriale est particulièrement riche en enzymes intégrales dont le fonctionnement dépend de l'intégrité de l'environnement lipidique (Chicco & Sparagna 2007). Il s'agit d'une importante part de l'activité métabolique cellulaire totale. En particulier, la production d'ATP est le départ de toute activité opposée à l'entropie et à la dérégulation et doit donc être maintenue de façon primordiale. Aucune étude précédente n'avait contrasté la force de la relation inverse IP-longévité entre ces deux types de membranes. Pour cette raison, le chapitre II fait progresser le domaine de recherche en suggérant l'une ou l'autre de ces deux avenues d'explication. Ces explications ne sont pas mutuellement exclusives et appuient toutes deux la possibilité d'une relation de cause à effet entre lipides membranaires et longévité plutôt que celle d'une simple corrélation.

Si la relation inverse IP-longévité se maintient face aux variations de température, les résultats de cette thèse montrent que la valeur absolue d'IP est néanmoins sujette à changement chez les bivalves. Chez les mammifères, la composition des membranes est sous contrôle homéostatique relativement serré. La proportion des classes d'AG de la diète doit être modifiée de façon majeure afin d'obtenir un changement mineur de la composition des membranes (Hulbert et al. 2005; Abbott et al. 2010). Cette résilience s'appuie en partie sur la capacité d'échange des AG entre les réserves lipidiques (triacylglycérols) et les PL membranaires. Opérés par un ensemble d'acyl transférases spécifiques aux classes de PL et d'AG, ces échanges permettent de puiser

rapidement à même les triglycérides pour obtenir les AG dont la teneur est déficiente dans la diète (Lands et al. 1982). La résilience des membranes des mammifères s'appuie également sur la capacité de synthèse *de novo* des AGHI à partir des précurseurs de chaque famille d'acide gras (oméga-6 et oméga-3) permettant de pallier une carence légère, mais soutenue. Chez les bivalves, les réserves de triglycérides sont généralement limitées (Bricelj et al. 2006). De plus, les AGHI tels que l'ADH et l'AEP sont dits essentiels puisqu'ils ne peuvent être synthétisés *de novo*. L'hypothèse émise pour le chapitre III était que les carences alimentaires et autres changements à la diète auraient moins d'impact pour *A. islandica* que pour les autres espèces étant donné son besoin relativement moins élevé en AGHI. Les résultats montrent toutefois que l'IP des membranes de bivalves peut être modifié par un simple changement d'abondance de microalgues chez toutes les espèces. Ces résultats démontrent que la différence relative d'IP entre deux espèces de longévité contrastée persiste malgré les fluctuations d'abondance de microalgues. Ce patron de réponse suggère qu'il n'y ait pas de cible fixe d'IP pour chaque espèce, mais plutôt un ajustement différentiel à l'environnement entre les espèces de longévité différente. Dans ce cas, le mécanisme sous-jacent pourrait reposer sur une différence relative de l'activité des acyles transférases responsables de l'incorporation spécifique des AG à partir de la diète. Ainsi, une même diète résulte en un IP différent entre les espèces le quel change en parallèle entre elles avec un changement de la diète.

Le caractère statique de la composition lipidique des membranes des endothermes repose également sur la capacité de maintien d'une température corporelle constante, laquelle évite le recours au remodelage lipidique induit par le froid. Le chapitre III était basé sur l'hypothèse que les changements de composition lipidique en réponse au froid seraient moins prononcés chez *A. islandica* dont le métabolisme général est plus lent. Les résultats montrent toutefois que les bivalves, comme plusieurs autres ectothermes marins, opèrent ce type de changement avec pour conséquence la modification de l'IP membranaire des mitochondries chez toutes les espèces. Les

données ne montrent pas que les valeurs d'IP convergent vers une cible commune lorsque les espèces de différente longévité sont exposées au froid. Le froid induit plutôt une augmentation de l'IP sans que les différences entre les espèces ne soient affectées. Ces résultats démontrent encore une fois que l'IP n'est pas un trait statique chez les bivalves comme il semble l'être chez les endothermes. Il est plutôt sujet à l'influence des facteurs biotiques et abiotiques de l'environnement. Les résultats suggèrent également que les différences d'IP entre des paires d'espèces de longévité différente resteraient constantes à travers les fluctuations de température. Ainsi, chez les bivalves, si les valeurs absolues d'IP ne sont pas statiques, les différences relatives entre espèces de différentes longévités vivant au sein d'un même milieu semblent se maintenir.

Une hypothèse secondaire du chapitre III était que la valeur d'IP ne change pas en fonction de l'âge chez les bivalves. L'analyse faite sur les *S. solidissima* de différents âges supporte cette idée. Aucun changement n'a été observé parmi les individus de longévité variable couvrant la période de croissance asymptotique. Une absence de changement d'IP en fonction de l'âge est bien plus compatible avec l'idée d'une relation de cause à effet avec la sénescence. La vitesse à laquelle la sénescence progresse dans les tissus somatiques des métazoaires est généralement décrite comme constante au cours de la vie. Si l'IP est lié à la sénescence par une relation de cause à effet, il devrait également rester constant. En effet, un changement de l'IP des membranes mitochondriales devrait changer le taux de peroxydation lipidique et donc le rythme d'accumulation des mutations à l'ADNmt. Au niveau des ERO primaires, l'étude de Philipp et al. (2005) chez *M. arenaria* montre que la production d'ERO par mg de protéines ne change pas avec l'âge. Les capacités de respiration en stade 3 déclinent par contre. Ces observations sont parfaitement compatibles avec une dégradation constante des capacités des mitochondries soutenues par un taux constant d'émission d'ERO primaires et secondaires.

L'observation selon laquelle l'environnement peut influencer la valeur absolue de l'IP chez les bivalves tout en conservant les différences relatives entre espèces n'est pas anodine. Ces résultats sont en effet nécessaires pour réconcilier les grandes différences de longévité entre populations à l'intérieur d'une même espèce. Par exemple, chez *A. islandica*, la longévité maximale rapportée entre six populations Européennes varie de 29 à 507 ans (Basova et al. 2012). Dans ce contexte, le maintien d'un IP statique chez les bivalves aurait été contradictoire avec la vision d'une relation de cause à effet avec la vitesse de sénescence. Chez les endothermes, la longévité est un trait fixe de l'espèce qui ne peut être modifié que par l'occurrence de traumatismes ou de pathologies. Aussi, ne voit-on pas de changement de vitesse de sénescence au sein de la même espèce en absence de ces conditions. En revanche, la longévité des bivalves fait partie des traits de leur biologie tels que l'âge à la maturité et la vitesse de croissance qui covarient entre les espèces (Ridgway, Richardson & Austad 2011) et entre les populations d'une même espèce. En ce sens, les observations du chapitre III ouvrent la possibilité d'une covariation inverse entre l'IP et la longévité entre les populations au sein d'une même espèce. Ces résultats sont en accord avec les nuances précises nécessaires à la démonstration d'une relation inverse IP-longévité chez les bivalves.

L'état actuel de la théorie du vieillissement par le stress oxydant mitochondrial

L'implication du stress oxydant dans le vieillissement est actuellement remise en question. La revue des contre-évidences dépasse le cadre de la présente contribution. Il importe de mentionner toutefois que les détracteurs ne distinguent pas toujours les nuances apportées par la théorie du vieillissement par le stress oxydant *mitochondrial*. Plus important encore, il est souvent oublié que le vieillissement n'est pas observé chez tous les animaux. Les organismes coloniaux (e.g. éponges hexactinellides) ne présentent parfois aucun signe de vieillissement et ces colonies de

cellules eucaryotes peuvent vivre jusqu'à plusieurs milliers d'années, voir dizaines de milliers (de Magalhaes & Costa 2009). En revanche, parmi les animaux non coloniaux (métazoaires) les causes proximales de mortalité n'ont parfois clairement pas de liens avec la sénescence. Par exemple, certaines espèces d'éphémères ne vivent qu'un seul jour au stade de développement final; elles vivent essentiellement jusqu'à épuisement de leur réserve énergétique puisqu'elles ne sont pas pourvues d'un appareil digestif. Les organismes du règne animal ne sont donc pas tous de bons modèles de longévité pour étudier la théorie du vieillissement par le stress oxydant mitochondrial. Bien que ceci soit évident dans le cas de l'éphémère, certaines autres espèces présentent une biologie plus ambiguës à interpréter. Nous devrions considérer qu'il existe des cas d'espèce dont la réalité physiologique est à mi-chemin entre celle de l'éphémère et celle d'un modèle de sénescence. Chez ces espèces, il serait possible d'observer une progression de la sénescence au niveau cellulaire sans pour autant qu'il s'agisse de la cause de mortalité proximale.

Le cas du nématode *Caenorhabditis elegans* est un bon exemple de modèle ambigu dans ce contexte. Introduit dans les laboratoires de génétique dans les années 1970 par Sydney Brenner, pour répondre au besoin d'un modèle génétique, cet organisme ne vit que 50 à 60 jours (de Magalhaes & Costa 2009). Fortement utilisé dans les études sur l'apoptose, il a naturellement été introduit dans les études sur la théorie du vieillissement par le stress oxydant, et sert depuis d'organisme champion à certains détracteurs de cette théorie (Yang & Hekimi 2010). Ces études ont-elles fait la démonstration qu'il existe un phénotype du vieillissement à l'échelle macroscopique et moléculaire comparable à celui observé chez les animaux supérieurs tel que les vertébrés avant de faire usage de ce modèle? Un rare point de ralliement entre les biogérontologistes est l'idée que le vieillissement soit multifactoriel. L'importance relative de différentes causes physiologiques dans l'établissement de la durée de vie change possiblement de façon drastique par exemple entre les espèces de très courte durée de vie et celle de durée de vie moyenne. Elle pourrait aussi changer entre les

grandes lignées évolutives ou entre les organismes à événement de reproduction unique et ceux visant une certaine pérennité et un nombre d'événements de reproduction indéterminés. Ainsi, la cause de mortalité proximale chez *Caenorhabditis elegans* pourrait bien n'avoir que peu de lien avec le stress oxydant sous une de ses formes et l'organisme n'avoir que peu d'intérêt pour l'étude de la sénescence. Ceci sans pour autant qu'il s'agisse d'un contre-exemple aux mécanismes proposés pour expliquer la progression de la sénescence telle qu'elle prend place sur plusieurs années chez d'autres organismes. Une façon de mieux cibler la question et éviter cette confusion serait peut-être de changer les termes « vieillissement » pour « sénescence » dans le nom de la théorie. Aussi, puisqu'il s'agit d'une hypothèse contestée, il serait approprié de remplacer le terme « théorie » par « hypothèse ». Ainsi nous devrions parler de « l'hypothèse de la sénescence par le stress oxydant mitochondrial ».

La présente contribution fait usage d'un modèle animal cohérent avec la question posée puisque la sénescence est documentée chez les bivalves (Abele et al. 2008; Strahl et al. 2007; Philipp et al. 2005). Les chapitres I à III montrent un fort appui à l'existence de relations inverses ERO-longévité et IP-longévité. Les résultats sont en accord avec l'hypothèse de la sénescence par le stress oxydant mitochondrial jusque dans certains détails très spécifiques à la physiologie et à l'écologie de ces espèces. Les bivalves étant très distants des vertébrés et beaucoup plus anciens d'un point de vue évolutif, les résultats sont un appui fort au caractère universel de l'hypothèse de la sénescence par le stress oxydant mitochondrial. Il s'agit en fait d'un rare cas d'étude apportant un support aussi complet à l'hypothèse.

Dans le cas de la relation ERO-longévité, les raisons pouvant expliquer le manque d'uniformité de la démonstration des études précédentes sont nombreuses. L'application de corrections statistiques pour la masse corporelle et les distances phylogénétiques sont susceptibles de faire perdre beaucoup de puissance de détection

de la relation. La variabilité inter individuelle est très élevée pour le taux de production des ERO. Plusieurs études ont obtenu des résultats qui vont dans le sens de la relation sans toutefois atteindre la différence statistiquement significative; une plus grande taille d'échantillon serait souvent nécessaire. La différence de longévité entre les espèces n'a possiblement pas été suffisante pour mettre en évidence la relation dans certaines études. Par exemple, le modèle des palourdes utilisé ici présente un facteur de 18 entre l'espèce de plus courte longévité et celle de plus grande longévité; aussi, le modèle supporte-t-il la relation ERO-longévité. L'étude de Montgomery et al. (2012) ne supporte pas la relation, mais le facteur présenté (moyenne de longévité de chacun des deux groupes d'oiseaux comparés l'un avec l'autre) n'est que de 4,9. Les conditions de métabolisme mitochondrial utilisées pour mesurer la production d'ERO ne sont pas uniformes entre les études et sont souvent non physiologiques. Par exemple, la combinaison succinate-roténone annule la contribution très importante du site de réduction de l'oxygène du complexe I (Buttemer et al. 2010b) à la production totale des ERO. Puisque plusieurs études ont localisé au niveau du complexe I l'origine de la différence de taux de production d'ERO entre leurs espèces (Barja 1999; St-Pierre et al. 2002; Lambert et al. 2010), cette combinaison de substrat et inhibiteur doit être remise en question.

Évidences de compromis évolutifs : support à la pléiotropie antagoniste

La théorie du vieillissement par le stress oxydant (mitochondriale ou non) se propose comme un mécanisme physiologique effecteur de la sénescence. Cette vision suggère un mécanisme précis, et est donc davantage en accord avec les théories évolutives dites adaptatives telles que la « pléiotropie antagoniste » et le « soma jetable ». La théorie du soma jetable ne prédit pas de compromis évolutif précis pour le gain de longévité. Elle se limite à prédire une moindre quantité d'énergie allouée à l'entretien et la pérennité des fonctions physiologiques. Ces changements peuvent prendre un

grand nombre de formes et représenter des différences bien légères et insaisissables d'un point de vue statistique entre les espèces de longévité divergente. Par contre, la théorie évolutive du vieillissement de la pléiotropie antagoniste prédit qu'un ajustement physiologique permettant de prolonger la durée de vie devrait être effectué au détriment d'un aspect d'efficacité fonctionnelle du système modifié. Le compromis devrait donc être en lien direct avec la fonction ayant été modifiée pour le gain de longévité et beaucoup plus circonscrit. Il est ainsi plus aisé de formuler des hypothèses pour tenter de trouver ce type de compromis. Le design du chapitre I a été prévu pour permettre de tester certaines de ces hypothèses.

Les mécanismes responsables de la moindre production d'ERO chez les espèces de grande longévité ont été étudiés chez les endothermes. Le trait le plus souvent rapporté est une moindre quantité ou capacité du complexe I relativement aux autres composantes du STE. Une telle organisation permettrait d'abaisser le niveau de réduction électronique des sites producteurs d'ERO des complexes I et III en réduisant le flux à l'entrée du STE (Barja & Herrero 1998; St-Pierre et al. 2002; Lambert et al. 2010). Dans l'étude présentée au chapitre I, l'activité du complexe I s'est révélée plus forte chez *M. arenaria* que chez *A. islandica* lorsque testée isolément des autres complexes, et ce, autant pour la normalisation par citrate synthase que par cytochrome *c* oxydase. Ce résultat valide donc, chez les mollusques bivalves, l'hypothèse mécanistique d'une moindre capacité/quantité de complexe I chez les espèces de plus grande longévité.

Cette explication est intéressante puisqu'il pourrait bien s'agir d'un compromis entre efficacité fonctionnelle et production d'ERO du type pléiotropie antagoniste. Le fait de diminuer les capacités catalytiques de la voie d'entrée des électrons dans le STE pourrait ralentir le flux d'électrons dans le système. Ceci est d'autant possible que le complexe IV est généralement vu comme étant en excès d'activité par rapport aux composantes en amont dans le STE. Les composantes en amont partageraient donc

une plus grande part du contrôle de flux. Nos résultats ne sont pourtant pas en accord avec cette hypothèse. Lorsque le métabolisme mitochondrial était alimenté en substrats du complexe I (glutamate et malate), nous n'avons trouvé de différence entre *A. islandica* et *M. arenaria* ni dans le stade III (ou III + ajout de cytochrome *c*), ni en condition de fonctionnement maximal du STE (induit par un découpleur). Cette absence de différence suggère que le compromis n'est pas un niveau du flux maximal d'électrons dans le STE.

Le compromis de fonctionnalité pourrait par contre être au niveau de la production d'ATP. Pour une consommation d'oxygène donnée, le taux de production d'ATP varie en fonction de l'importance du cycle futile des électrons (retour libre des électrons dans la matrice) et de la proportion des électrons qui entrent dans le STE par le complexe II i.e. sans activer la pompe à protons du complexe I. Encore une fois, ceci ne semble pas le cas. Lorsque comparée à *M. arenaria*, *A. islandica* a présenté un plus faible stade 2 et un stade 3 égal résultant en un RCR plus élevé. Cette différence suggère un cycle futile des électrons atténué chez *A. islandica*. L'activité du complexe II était également moindre chez *A. islandica* que chez *M. arenaria*. Ensemble, ces indicateurs démontrent qu'autant ou plus de protons sont rendus disponibles pour la production d'ATP par l'ATP synthase pour chaque mole d'oxygène consommée chez *A. islandica*. Il aurait été très intéressant d'ajouter la mesure du rapport ATP/O pour trancher la question de façon plus directe. Néanmoins, les indicateurs indirects décrits précédemment ne suggèrent pas que la production d'ATP puisse être compromise par les changements permettant de réduire la production d'ERO tel qu'attendu par la pléiotropie antagoniste.

Chez les bivalves, l'oxydase alternative (AOX) représente une possibilité évidente de mécanisme permettant de diminuer la production d'ERO (Abele & Puntarulo 2004). Le passage des électrons par l'AOX évite les deux sites producteurs d'ERO du complexe III (site O et site I) et abaisse le niveau de réduction électronique du pool

d'ubiquinone, et donc celui des sites de production d'ERO des complexes I et III à la fois (Lenaz & Genova 2010). Le recrutement de l'AOX pourrait représenter un parfait compromis de type pléiotropie antagoniste. Le passage des électrons par l'AOX évite deux pompes à protons (complexe III et IV) et diminue ainsi grandement la production d'ATP par unité d'énergie introduite dans le STE. Le chapitre I a toutefois montré qu'en condition de convergence des électrons (CE), l'activité de l'AOX n'est pas supérieure chez *A. islandica*. Lorsque le stade 3 est partiellement inhibé par l'antimycine A, la composante SHAM-sensible de la respiration (attribuable à l'AOX) était plus élevée chez *M. arenaria*. Lorsque recrutée par une élévation de la PO_2 la respiration attribuable à l'AOX n'était pas non plus supérieure pour *A. islandica*. Il s'agit des premières évidences à l'effet que l'AOX ne jouerait pas de rôle déterminant, en conditions physiologiques normales, dans la modulation de la production d'ERO chez les bivalves. La mesure de l'activité de l'AOX ne permet donc pas de supposer un compromis évolutif entre production d'ATP et consommation d'énergie par le STE.

S'il est difficile à ce point de démontrer un compromis entre longévité et performances dans le cadre de la relation inverse ERO-longévité, il est beaucoup plus facile de le faire pour la relation inverse IP-longévité. L'association inverse entre la teneur en AGHI et l'activité des enzymes transmembranaires est maintenant très bien démontrée (Turner et al. 2005; Turner et al. 2006), particulièrement dans le cas du DHA, l'acide gras de plus grande contribution à l'élévation de l'IP (Turner et al. 2003). La relation qui lie la teneur en AGHI, la longévité et le taux métabolique est au cœur de la « membrane pacemaker theory of aging » (Hulbert 2010). Ainsi, une diminution de la susceptibilité à l'oxydation des lipides membranaires se traduit directement par une perte de la capacité catalytique des enzymes.

La quiescence facultative induite par le froid chez *M. mercenaria*

Les études sur le remodelage lipidique induit par le froid chez les ectothermes avaient séparé les organismes en deux classes i.e. les organismes actifs qui présentent un remodelage lipidique et les organismes qui entrent en dormance ou en quiescence pendant la saison froide et qui ne présentent pas ce type de changement (révisé dans Moyes & Ballantyne 2011). Dans la partie la plus septentrionale de son aire de distribution, *M. mercenaria* cesse de filtrer et de croître en dessous d'un seuil de 6-7 °C (révisé dans Grizzle et al. 2001, mais voir aussi Bricelj et al. 2006). Cette apparente quiescence est donc facultative et dépendante de la température. Des études précédentes sur l'espèce avaient établi l'occurrence du remodelage des AG entre >20 et 8 °C (Pernet et al. 2006; Parent et al. 2008). Une autre étude ne trouvait pourtant aucune différence sur ce point entre les températures de 12 et de -1 °C (Gillis & Ballantyne 1999) en utilisant les mitochondries de branchies. Puisque le remodelage lipidique devrait avoir lieu dans toutes les membranes et en particulier dans les membranes mitochondriales (Hazel & Williams 1990), ces résultats pourraient sembler contradictoires à priori. Pourtant, lorsque l'on regarde les températures impliquées, elles suggèrent plutôt une cessation du remodelage lipidique associée à l'entrée en quiescence facultative chez cette espèce. Pour tester cette question, il était important d'arriver à montrer que *M. mercenaria* cesse le remodelage lipidique alors que d'autres espèces maintenues dans les mêmes conditions continuent de l'opérer. Les résultats du chapitre IV montrent des signes de remodelage lipidique induit par le froid dans les membranes mitochondriales d'*A. islandica* et de *S. solidissima* entre les saisons. En accord avec l'hypothèse d'un rôle particulier pour les AGHI dans l'adaptation au froid, le niveau de ceux-ci dans les mitochondries est significativement descendu entre l'hiver et l'été chez *A. islandica* et la même tendance a tout juste failli à produire une différence significative chez *S. solidissima*. En accord avec la HVA, le CFI des mitochondries de *S. solidissima* est significativement descendu de l'hiver à l'été. Finalement, en accord avec notre

hypothèse, aucun de ces changements ne s'est produit dans le sens attendu chez *M. mercenaria*, suggérant une absence de remodelage lipidique induit par le froid entre les températures de 12 et de 2 °C. Le chapitre IV représente donc la première étude à suggérer que le remodelage lipidique puisse être facultatif chez une espèce plutôt que d'être un trait fixe de la réponse aux changements de saison. Un parallèle évident s'impose avec les endothermes dans les régions tempérées. Chez ces espèces, la saison froide entraîne une augmentation des coûts énergétiques du maintien de la température corporelle au même moment où la disponibilité des ressources chute. Pour faire face à cette contrainte énergétique, ces espèces peuvent montrer soit une réponse d'hibernation complète, soit un maintien de l'activité avec accroissement de l'activité de recherche de nourriture ou encore l'entrée occasionnelle et stochastique dans un état de torpeur de faible profondeur appelé torpeur facultative (Geiser & Ruf 1995; Geiser 1998). L'expression de la torpeur facultative est conditionnelle à l'abaissement de la température sous un seuil minimal au cours de la saison froide. Ce seuil peut toutefois être influencée par la disponibilité des réserves (Geiser 1988), du moins chez les endothermes. En ce sens, il serait intéressant de poursuivre la recherche sur la quiescence facultative chez *M. mercenaria* pour investiguer de possibles facteurs pouvant moduler la valeur de la température seuil pour la cessation de l'activité et du remodelage lipidique.

Le chapitre IV montre de plus que l'état de quiescence est associé à un plus fort niveau de stress oxydant. Les valeurs de malondialdéhyde (MDA) et d'hydroperoxydes lipidiques chez *M. mercenaria* étaient à leur plus élevé à l'automne, au moment où la température vient tout juste d'atteindre le plateau hivernal de 2°C dans nos bassins. Les niveaux ont par la suite descendu durant l'hiver et encore de l'hiver à l'été. La quiescence facultative entraînerait donc une perte d'homéostasie associée à un stress oxydant. Cette hypothèse est certainement en accord avec l'occurrence de mortalité hivernale chez les juvéniles de l'espèce dans la partie la plus septentrionale de l'aire de distribution (Bricelj et al. 2006). Les résultats

du chapitre IV ne permettent toutefois pas de distinguer la chaîne de causalité. Il est possible qu'une limite thermique de l'activité des transacétylase empêche le remodelage lipidique, induisant une quiescence forcée accompagnée d'une perte de contrôle métabolique. À l'inverse, une limite thermique du métabolisme pourrait entraîner la quiescence, laquelle à son tour commande un arrêt volontaire du remodelage lipidique. Chez les mammifères, la torpeur facultative ou non, est également une condition délétère associée à un stress oxydant. Elle ne semble exprimée qu'en cas de nécessité de maintien du budget énergétique pendant la saison froide (French 2000; Humphries et al. 2003; Munro et al. 2005).

Une cessation du remodelage lipidique induit par le froid sous le seuil de 6-7 °C chez *M. mercenaria* entraînerait la perte du maintien de sa différence absolue d'IP avec les autres espèces restant actives à ces températures. L'écart avec *A. islandica* s'en trouverait réduit. Ceci ne devrait par contre pas mener à un ralentissement de la vitesse de sénescence étant donné la recrudescence de la peroxydation lipidique associée.

Perspectives

La poursuite de la recherche dans le cadre théorique du vieillissement par le stress oxydant mitochondrial gagnerait à mieux définir les critères des modèles de longévité. Par exemple, il serait utile de définir les traits caractéristiques de la sénescence. Il faudrait ensuite s'imposer d'en vérifier la présence dans un modèle animal avant de l'utiliser pour valider ou invalider les théories sur les mécanismes sous-jacents à sa progression. Il importe ensuite de bien préciser la nature du mécanisme investigué étant donnée la complexité des processus pro et anti-oxydants ayant lieu dans la cellule. Une fois ces distinctions de fond bien établies, plusieurs améliorations aux méthodes restent désirables dans chacun des domaines de recherche sur l'un ou l'autre des mécanismes explicatifs investigués jusqu'à présent.

Par ailleurs, plusieurs modèles animaux qui présentent des tailles et origines évolutives rapprochées pour de grandes divergences de longévité restent encore inexplorés. Par exemple, les moules d'eau douce représentent un modèle de longévité très similaire à celui des bivalves marins. L'espèce détenant le record de durée de vie est *Margaritifera margaritifera*, une moule associée aux rivières à saumons présente dans l'est de l'Amérique. On retrouve aussi cette espèce en Europe, où un individu de 190 ans a été trouvé dans une population du nord de la Russie (Haag & Rypel 2011). *M. margaritifera* partage une taille similaire à plusieurs espèces abondantes du nord de l'Amérique telles que *Pyganodon grandis*, *Elliptio complanata* et *Amblema plicata* dont les longévités se distribuent entre 17 et 54 ans. Ensemble, ces moules forment un très intéressant modèle pour tenter une confirmation des deux relations investiguées dans ce travail.

Chez les mammifères, le groupe des chauves-souris présente de très grandes longévités à taille égales lorsque comparé au groupe des rongeurs. Par ailleurs, une comparaison croisée entre une espèce de chauve-souris, la souris commune (*Mus musculus*) et le bœuf serait très intéressante. La petite chauve-souris brune et le bœuf ont des longévités comparables (respectivement 34 et 20 ans), mais une taille évidemment très différente (de Magalhaes & Costa 2009). La souris commune vit beaucoup moins longtemps (4 ans) mais sa taille est similaire à celle de la chauve-souris. Le modèle permettrait de distinguer les traits qui varient autant avec la taille qu'avec la longévité de ceux qui ne varient qu'avec la longévité. Idéalement, ces comparaisons croisées devraient être répétées avec deux ou trois modèles différents. Il serait alors très intéressant, par exemple, de voir si les changements aux lipides membranaires sont vraiment les mêmes dans le cas d'une différence de taille et dans le cas d'une différence de longévité. Des nuances pourraient être trouvées qui auraient un potentiel important pour aider à distinguer les relations de cause à effet des covariations.

Perspectives pour la mise en évidence d'une relation inverse ERO-longévité

L'approche utilisée jusqu'ici pour tenter de démontrer l'existence d'une relation inverse ERO-longévité est trop simpliste et possiblement responsable de l'hétérogénéité des résultats. Dans le contexte de la théorie du vieillissement par le stress oxydant mitochondrial, la question biologique posée est la suivante : y a-t-il un moindre flux d'ERO dirigé vers l'ADNmt des espèces de plus grande longévité. Or, à ce jour, les études ont toujours normalisé la production d'ERO par mg de protéines mitochondriales. Le flux d'ERO net dirigé contre l'ADNmt dépend pourtant aussi de la quantité d'ADNmt. L'ADNmt peut être quantifié pour les tissus d'un organisme par PCR quantitative en temps réel. L'ajout de cette donnée permettrait de placer la quantité d'ADNmt au niveau du dénominateur de la variable. Puisque la quantité d'ADNmt est très variable entre les organismes et organes, il serait intéressant de voir si de nouvelles relations plus claires émergent avec cette approche.

Une autre question biologique est également intéressante, quel est le taux de production d'ERO pour une quantité donnée d'ATP produite par les mitochondries? Le ratio ATP/O peut être quantifié facilement en respirométrie haute résolution e.g. il s'agit de mesurer la consommation d'ADP en parallèle à la mesure de la consommation d'oxygène. La production d'ATP (déduite de l'ADP consommé) pourrait être utilisée au dénominateur. Cette approche pourrait elle aussi faire apparaître des relations intéressantes jusqu'ici passées inaperçues.

L'utilisation d'isolats mitochondriaux pour la quantification de la production d'ERO par les mitochondries est de plus contestée, mais possiblement moins biaisée dans ce contexte de recherches. Les mitochondries sont majoritairement présentes sous forme d'un réseau au sein des cellules et non sous forme d'unités libres indépendantes. Ces réseaux sont en partie brisés par les procédures d'isolation par centrifugation différentielle communément utilisées. Il est proposé que les fragments de réseaux ne se referment et ne rétablissent le gradient de protons qu'après avoir perdu une

certaine quantité de contenu enzymatique matriciel (Picard et al. 2011). La perméabilisation partielle des cellules permettant la diffusion des substrats et inhibiteurs vers le réseau mitochondrial est une alternative qui présente plusieurs mérites. Ces fibres perméabilisées sont reconnues pour produire moins d'ERO que les mitochondries isolées (Picard et al. 2011). Puisque l'approche des fibres perméabilisées est moins invasive, cette différence est vue comme étant un artéfact de l'isolation des mitochondries. Plusieurs facteurs sont susceptibles d'expliquer cette différence. L'isolement des mitochondries pourrait mener à une perte d'une proportion des enzymes antioxydantes matricielles suivant le fractionnement/refusionnement du réseau mitochondrial. Les fibres perméabilisées contiennent encore des enzymes antioxydantes fonctionnelles. Les substrats ne diffusent pas au même rythme vers le STE dans les fibres perméabilisées, une diffusion ralentie pourrait limiter le niveau redox instantané des sites de réductions de l'oxygène du STE et donc la production d'ERO des fibres perméabilisées. L'utilisation de la saponine pour perméabiliser les fibres n'est probablement pas parfaitement sélective, il est généralement observé que les fibres perméabilisées montrent un plus faible RCR que les mitochondries isolées. Une perméabilisation partielle de la membrane interne abaisserait la force proton motrice et la production d'ERO, surtout en présence de succinate.

Bien que l'approche des fibres perméabilisées gagne en intérêt, elle ne permet pas de répondre adéquatement à toutes les questions. Lorsque cette approche est utilisée, la mesure de la production d'ERO par le système Amplex red/peroxydase du raifort représente une mesure intégrée de la production cellulaire totale d'ERO. Cette mesure n'est donc pas appropriée à l'étude de la théorie du vieillissement par le stress oxydant mitochondrial. Selon cette théorie, la différence recherchée entre les espèces ne concerne pas le stress oxydant cellulaire, ni la contribution des autres sources d'ERO cellulaires, mais bien le flux d'ERO mitochondrial dirigé vers l'ADNmt. De plus, l'Amplex red, ne diffuse pas de part et d'autre des membranes biologiques. Bien

qu'il puisse diffuser vers l'intérieur du milieu cellulaire via les pores créés par le détergent utilisé pour traiter les fibres (habituellement la saponine), la présence des défenses antioxydantes cytosoliques pourrait créer un biais. La diffusion limitée de l'Amplex red leur permettrait de séquestrer une proportion non négligeable des ERO. Si la mesure de la production d'ERO par les mitochondries ne produit pas des valeurs aussi représentatives des conditions physiologiques, les différences absolues entre espèces, elles, seront plus justes. Ces différences seront plus représentatives des différences de flux d'ERO vers l'ADNmt. Pour ces raisons, l'évaluation critique de la théorie du vieillissement par le stress oxydant mitochondrial ne devrait donc pas considérer l'utilisation des fibres perméabilisées tel que le font, avec raison, d'autres domaines de recherche.

Par ailleurs, l'implication du complexe II dans la modulation de la production d'ERO semble prometteuse en tant que mécanisme sous-jacent aux différences interspécifiques reliées à la longévité. Le chapitre I montre que l'activité de ce complexe est environ sept fois supérieure pour *M. arenaria* lorsque comparée à *A. islandica*. Ceci s'accorde avec deux études précédentes. Une plus faible activité du complexe II est aussi retrouvée comme conséquence d'une restriction calorique qui prolonge la durée de vie des rats (Caro et al. 2008) et caractérise les lignées de mouches drosophiles de plus grande longévité. Le complexe II pourrait jouer un rôle indirect, mais important comme promoteur de la production d'ERO. Il est connu que le succinate utilisé seul résulte dans une plus grande production d'ERO que pour les substrats du complexe I. Ceci reste vrai même en absence d'inhibiteurs du complexe III. Les capacités catalytiques du complexe II étant plus grandes que celles du complexe I, sont utilisées pour alimenter le STE résulte en un plus fort niveau de réduction électronique du pool d'ubiquinone. Cette condition favorise la production d'ERO par les trois sites directement reliés au pool d'ubiquinone, soit le centre fer-soufre N2 du complexe I et les deux sites (intérieur et extérieur) du complexe III (voir figure 0.8 de l'introduction). Aussi, le sens de circulation des électrons évoqué par les

termes PAE et PIE ne reflète que la tendance nette. Une forte réduction du pool d'ubiquinone conduira à une certaine proportion des électrons empruntant la voie de PIE par principe que le sens des réactions enzymatiques n'est que le résultat net de la réaction ayant lieu dans les deux directions. Ainsi, une plus grande activité du complexe II pourrait augmenter la proportion de PIE en conditions physiologiques de CE, en addition à la maintenance d'un fort niveau de réduction électronique des sites de production d'ERO normalement impliqués. De plus, il est maintenant démontré que le complexe II soit capable d'une production directe d'ERO non négligeable, contrairement à ce qui était présenté jusqu'à très récemment (Quinlan et al. 2012). L'implication du complexe II dans une possible différence de production d'ERO entre les espèces est une hypothèse entièrement nouvelle. Elle reçoit l'appui de trois sur trois études ayant mesuré l'activité du complexe II jusqu'à maintenant et est supportée par une forte base mécanistique théorique. La part de la différence entre les espèces attribuable à ce mécanisme pourrait bien avoir passé inaperçue jusqu'à maintenant. Il faut en effet utiliser les substrats du complexe I en association avec le succinate pour permettre à ce phénomène de se mettre en place (CE). Jusqu'à maintenant, les études ne se sont limitées qu'à utiliser les substrats du complexe I ou le succinate séparément l'un de l'autre, mais la condition de CE est généralement omise. Il pourrait s'agir d'une explication à l'observation que la relation ERO-longévité ne reste valide après correction pour la masse et la phylogénie que pour la condition de PIE (Lambert et al. 2007) i.e. les différences entre espèces ne deviennent réellement importantes que lorsque le complexe II est impliqué. Les recherches futures sur la relation ERO-longévité devraient inclure la condition de CE pour s'assurer de saisir cette possible différence entre les espèces. Elles devraient également inclure le complexe II dans les mesures de contenu ou activité des complexes du STE.

Perspective pour la poursuite de la recherche sur la relation inverse entre la susceptibilité à l'oxydation des membranes et la longévité

Il serait surprenant que la relation inverse entre susceptibilité à la peroxydation lipidique des membranes et longévité ne repose que sur un ajustement de l'IP. Plusieurs autres facteurs sont susceptibles d'affecter le taux de peroxydation lipidique membranaire. Les antioxydants liposolubles tels que les tocophérols (Vit E) jouent un rôle de premier plan en permettant de stopper les réactions en chaîne de peroxydation lipidique. À l'inverse des défenses antioxydantes enzymatiques et moléculaires hydrosolubles généralement investiguées, les défenses antioxydantes liposolubles trouvées dans la membrane interne des mitochondries devraient influencer le taux de production des ERO secondaires. L'observation d'une tendance à l'augmentation des plasmalogènes en fonction de la longévité chez les bivalves (au chapitre II de cette thèse) ouvre une possibilité additionnelle qui ne pourra être ignorée. Ces résultats représentent un potentiel de réconciliation entre les études précédentes sur l'IP du cerveau et des autres organes en fonction de la longévité.

La relation IP-longévité ne souffre d'aucun contre-exemple depuis son introduction et parmi les 17 études sur le sujet à l'exception du cas d'un organe i.e. le cerveau. L'IP n'a jamais pu être relié à la longévité dans cet organe, ce qui représente une faille importante dans la démonstration de la « pacemaker theory of aging » en regard de l'implication critique de cet organe dans le vieillissement. Ce cas particulier pourrait s'expliquer par la nécessité d'une biochimie particulière au niveau des neurones, commune à tous les vertébrés, permettant au tissu nerveux de supporter les processus électriques dans des limites étroites dictées par les lois de la physique (Hulbert 2008). Cette biochimie demanderait, entre autres choses, un taux d'AGHI élevé et invariable pour la composition des membranes des neurones (Hulbert, Faulks, et al. 2006). Mais un IP élevé n'est pas nécessairement lié à un taux de peroxydation lipidique élevé dans une membrane. Les membranes biologiques du tissu nerveux sont très riches en

plasmalogènes qui peuvent agir comme défenses antioxydantes (Kuczynski & Reo 2006).

Dans cette thèse, nous avons trouvé que les plasmalogènes étaient généralement élevés chez les espèces de grande longévité, sans pour autant trouver de corrélation significative. L'inclusion d'un plus grand nombre d'espèces aurait pu révéler cette relation. Cette avenue devrait être explorée. Une augmentation de la proportion des plasmalogènes membranaires pourrait agir en parallèle ou en remplacement d'une diminution d'IP pour moduler la peroxydation lipidique membranaire et donc moduler la longévité dans le cas des membranes mitochondriales des neurones. Ainsi, dans le cas du cerveau, la relation inverse entre la longévité et la susceptibilité à la peroxydation lipidique des membranes pourrait reposer sur le recrutement des plasmalogènes chez les espèces de plus grande longévité. Le cœur contient également une proportion non négligeable de plasmalogènes chez les vertébrés. Bien que la relation IP-longévité ait été démontrée pour cet organe, une part supplémentaire de la relation intégrée entre longévité et susceptibilité à l'oxydation des membranes pourrait être trouvée dans le recrutement des plasmalogènes. Il serait possible d'aller plus loin encore en tentant d'inclure la proportion des antioxydants membranaires tels que les tocophérols. La terminologie du domaine devrait alors changer pour représenter une vision plus holistique. Les publications futures pourraient abandonner les termes « Homeoviscous-longevity theory of ageing » et « Pacemaker theory of aging » au profit d'une expression plus neutre et inclusive comme « la relation inverse entre longévité et propension à l'oxydation des membranes », ou en anglais « Membrane oxydation – hypothesis of aging ».

L'espèce *A. islandica* offre une possibilité extraordinaire pour poursuivre la recherche sur la relation étendue entre susceptibilité à la peroxydation lipidique des membranes et longévité. La majorité des études comparatives sur les modulateurs de la sénescence ont utilisé des espèces qui ne présentent que très peu ou pas de variation

de longévité en absence de conditions pathologiques. Les bivalves présentent toutefois de grandes variations dans la longévité maximale des individus entre les populations de la même espèce. Ceci est déjà documenté dans le cas d'*A. islandica*. Alors que la population de l'Islande produit des records de longévité, dont l'individu de 507 ans (Wanamaker et al. 2008; Butler et al. 2013), l'échantillonnage des populations de la mer blanche en Russie et de la baie Kiel au Danemark n'a pas réussi à mettre en évidence des longévités de plus de 53 et 29 ans respectivement (Basova et al. 2012). La démonstration d'une relation inverse entre la susceptibilité à l'oxydation des membranes et la longévité maximale rapportée pour les populations d'*A. islandica* serait une découverte formidable. Cela suggérerait que les mêmes modulateurs de la longévité sont à l'œuvre de façon interspécifiques tout comme intraspécifique. Il serait important d'investiguer cette possibilité pour les implications qu'elle représente sur notre compréhension de la modulation de la longévité au niveau physiologique. Si un modulateur important de la longévité est caractérisé par une variabilité phénotypique aussi grande que la variabilité interspécifiques, alors les bases de la longévité ne sont possiblement que très peu fixées par le génôme. L'approche génomiques devrait alors être relativisée quant à sa capacité à cerner les modulateurs physiologiques de la longévité. Il n'y a présentement aucun autre modèle animal équivalent pour répondre à cette question. Seul *A. islandica* présente presque autant de variation de longévité entre les populations que dans la comparaison avec les autres espèces évolutivement rapprochées et de taille similaire.

Synergie entre production des ERO et IP

Lorsque démontrées en parallèle l'une de l'autre au sein de la même espèce, les relations inverses ERO-longévité et IP-longévité devraient être considérées comme une seule adaptation intégrée permettant de réduire le flux d'ERO total vers l'ADNmt. Cette considération est valable pour la voie de la peroxydation lipidique induite par les ERO primaires et conduisant à la production d'aldéhydes réactifs à proximité l'ADNmt. Dans ce cas, une baisse du signal (production d'ERO)

concomitante à une baisse de la capacité d'amplification (IP) devrait avoir un effet multiplicatif et non additionnel. Pour illustrer ce principe, suggérons une comparaison hypothétique entre deux espèces telle que l'une est caractérisée par une baisse de 50% par rapport à l'autre, et ce, autant pour la production des ERO primaires que pour la propension à la peroxydation lipidique des membranes. Chez l'espèce de moindre production d'ERO, la production des aldéhydes réactifs correspondra à $0.5 \text{ (signal)} * 0.5 \text{ (amplification)} = 0.25 \text{ (total)}$ de celle de l'autre espèce et non pas seulement 0.5. Bien que les deux processus générateurs d'ERO ne participent probablement pas à valeur égale à l'attaque de l'ADNmt, l'exercice a tout de même le mérite de démontrer l'effet synergétique de leur modulation parallèle. Pour refléter cet aspect synergétique, un nouveau nom serait nécessaire. Nous proposons ici « l'hypothèse du vieillissement de la synergie ERO-IP du flux d'ERO total vers l'ADNmt », ou plus simplement : l'hypothèse de la synergie ERO-IP du vieillissement.

Les cas de modèles évolutifs pour lesquels la double démonstration de la relation inverse ERO-longévité et IP-longévité est faite pour le même organe sont très rares. Les chapitres I et II de cette thèse démontrent ces deux relations chez les bivalves et permettraient d'aborder l'aspect intégré. Il faut toutefois admettre que les tissus utilisés n'étaient pas les mêmes (chapitre I : manteau; chapitre II : branchies). Outre le cas des bivalves, la possibilité d'une synergie ERO-IP a été démontrée dans la comparaison entre le rat et le pigeon (Pamplona et al. 1996; Pamplona, Portero-Otin, Requena, et al. 1999; Ku & Sohal 1993; Barja et al. 1994; Herrero & Barja 1997b; Barja & Herrero 1998), quoique la partie concernant la relation ERO-longévité ait été remise en question récemment (Montgomery et al. 2011). La synergie ERO-IP est également supportée par l'approche expérimentale. La restriction calorique chez le rat réduit la production des ERO primaires (révisé dans Pamplona & Barja 2006) et inverse la tendance à l'augmentation de l'IP avec l'âge, produisant en une différence significative avec le groupe contrôle en âge avancé (Lambert et al. 2004). De plus, il y a des évidences selon lesquelles une plus grande proportion d'AGHI dans les

membranes induit directement une hausse de la production des ERO primaires par le STE (Herrero et al. 2001). Il pourrait donc s'agir d'un mécanisme dont la régulation est intégrée de façon partiellement passive; les gènes ayant un effet sur la composition des membranes auraient aussi un effet partiel sur la production des ERO primaires.

La question biologique posée par l'hypothèse de la synergie ERO-IP du vieillissement est donc différente de celles posées par les relations ERO-longévité et IP-longévité. La différence recherchée entre les espèces devrait être trouvée au niveau du flux d'aldéhydes réactifs total dirigé vers l'ADNmt. Il est intéressant de considérer que cette différence puisse être plus prononcée entre les espèces de différentes longévités. Ainsi, la production des ERO primaires ou encore l'IP pourraient bien être similaires entre des espèces de longévité différentes alors que leur effet multiplicatif est différent. La mesure de cette variable en temps réel sur des échantillons biologiques fraîchement isolés représente un très grand défi. Une avenue à considérer pour les études futures serait simplement de mesurer la proportion des adduits à l'ADNmt formés par les aldéhydes réactifs provenant de la peroxydation lipidique. Selon l'hypothèse, une proportion plus faible de ces adduits devrait être trouvée à âge biologique (% de la longévité maximale) égal chez les espèces de plus grande longévité. Cette mesure peut être faite à posteriori sur des tissus congelés et elle intègre automatiquement une normalisation par la quantité d'ADNmt.

ANNEXE A

SUPPORTING INFORMATION – CHAPTER I

A.1 Complementary experimental procedures

A.1.1 Bivalve collection and care

We stabilized the individuals in common condition of temperature, salinity and food regime for at least one month before conducting the analysis. This allowed expression of the genetically based differences and not adaptation to local environment. The water flowing into our tank system was the same of the tank of the research station. It is pumped from the St-Lawrence River, partially filtered, but known by technicians to contain wild microalgae that allow greater diversity in food source. The temperature in the tank naturally fluctuates with season, ranging from 4 to 12 °C between winter and late summer. It allowed maintaining the natural cycle homogeneity for bivalves collected during different periods.

A.1.2 Size and age of sampled individuals

Bivalve growth patterns are best described by a Von Bertalanffy growth function: it is very rapid in the first years of growth until it reaches an inflexion point in the curve, and enters an asymptotic phase of shell growth afterwards (slow indefinite growth). In *A. islandica*, previous studies have shown that physiological traits such as antioxidant defences can change over the first 30 years of life. However, they tend to remain stable throughout the period of slow asymptotic growth (Abele et al. 2008).

The onset of asymptotic growth can occur at a very different biological age (chronological age / longevity) for different species. For instance, it occurs at 36 to 50% vs. 5 to 10% of the maximum life potential for *M. arenaria* vs. *A. islandica* (Brousseau 1979; Abele et al. 2008). This contrasts with aging in mammals, which follows a biological program with distinct phases, such as menopause, that are reached at comparable biological ages among close species. For these reasons, bivalves should not be compared on the basis of biological age. Instead, individual should be chosen whenever they are at or slightly after the inflexion point in the growth curve, see Ungvari et al. (2011) for a slightly different approach of the same problem. In this study, we used individuals that are at the onset or within the period of asymptotic slow growth. *Mya arenaria* individuals of the sampled population (Bic, QC, Canada) attain maturity at a size of 41–42 mm and reach a maximum of 96 mm (Brulotte & Giguère 2007; Giguère et al. 2007). The characteristic of this population is similar in the Bay of Fundy (Canada), where rapid growth ceases at about 80 mm (Brousseau 1979). We used individuals that range in size from 57 to 104 mm (mean = 78.7, SD = 10.4 mm). *Spisula solidissima* individuals of the sampled population (Îles-de-la-Madeleine, QC, Canada) are mature at 4–5 years (75 mm), maintain rapid growth up to the age of 6 years, and can reach 130 mm (Giguère et al. 2005). Our individuals ranged between 119 and 136 mm (mean = 125.0, SD = 7.8), which correspond to 9 and 18 years respectively, according to the Von Bertalanffy growth function for the population. No studies are available for the *Arctica islandica* population of the Îles-de-la-Madeleine where our individuals were sampled. However, in closely surveyed Canadian populations (Sable Bank and St. Marys Bay, Nova Scotia), sexual maturity is reached at 30.96 and 48.1 mm, which corresponds to ages of 8.2 and 12.8 years respectively (Roddick, Kilada, et al. 2007; Roddick, Mombourquette, et al. 2007). Growth is reported to be rapid during the first 25 years of age for the Sable Bank population (Roddick, Kilada, et al. 2007). The 40 individuals originally provided to us by the diver were of very similar size (mean = 82.9, SD = 9.7, min = 60, max = 97 mm); however, age readings in a subsample of 16

of these individuals (for the purpose of another study) revealed wide variations in age (mean = 64, SD = 14, min = 50, max = 104 years). These information along with the absence of observations of smaller quahogs during routine dives over the year (personal communication with the professional diver), suggests that no larval recruitment occurred in this precise location over a period of time at least sufficient for individuals of all cohorts to have reached the phase of asymptotic growth. Therefore, the individuals that we used should also be between 50 and 100+ years old and had definitely entered the phase of asymptotic growth.

A.1.3 Isolation of mitochondria

Isolation buffer composition: 400 mM sucrose, 100 mM KCl, 70 mM HEPES, 6 mM EGTA, 3 mM EDTA, 1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ aprotinin, 1% BSA, pH 7.6.

Respiration buffer composition: 550 mM sucrose, 150 mM KCl, 70 mM HEPES, 10 mM KH_2PO_4 , 0.2% BSA, pH 7.4.

Choice of tissue: the mantle tissue was chosen since it is the largest organ made of somatic tissue and provided mitochondria with the highest RCR during preliminary analysis. Furthermore, previous studies on mitochondrial isolates from bivalves were essentially obtained with this tissue, which allowed comparisons with our study.

A.1.4 Mitochondrial hydrogen peroxide production

A first sequence of measurements was initiated in the presence of succinate (10 mM) driven state 2 respiration, and successive additions of ADP (5 mM) and of antimycin A (1 μM) + oligomycin (2 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) allowed measurements of H_2O_2 production rate during state 3 and during reversed electron flow, respectively. A second sequence was initiated with glutamate (24 mM) + malate (10 mM) driven state 2 respiration, and successive additions of succinate (10 mM) and ADP (5 mM) allowed measurements of H_2O_2 production of states 2 and 3 during convergent electron flow.

The uncoupler FCCP was then added to allow the measurement of ETS capacity (uncoupled convergent electron flow). Preliminary tests revealed no H_2O_2 production in a control containing all substrates and the detection system without mitochondria. Further addition of mitochondria did not allow detection of H_2O_2 production unless substrates were added. Additional tests conducted in the presence of known amount of H_2O_2 revealed no direct interaction between the Amplex red®/horseradish peroxidase detection system and the inhibitors used in the sequences with the exception of SHAM. The addition of SHAM in the detection system prevented the normal reaction with H_2O_2 to occur, producing a copper colouration instead of the usual pink colouration and greatly diminished the fluorescence of the standard. For this reason, we did not use SHAM to measure the direct effect of AOX inhibition on H_2O_2 production.

Results are presented normalized by citrate synthase activity. The use of citrate synthase as a biomarker of mitochondrial density is increasingly used in the field of high resolution respirometry to avoid bias resulting from different proportion of non-mitochondrial protein present in the mitochondrial isolation of different species or organs. According to Larsen et al. (2012) which evaluated 13 potential biomarkers, citrate synthase activity is the second best biomarker, slightly behind cardiolipin content. The use of a precise biomarker is especially important with bivalves since these organisms have very low cellular mitochondrial density and will therefore contain much more non-mitochondrial protein than vertebrates. Furthermore, the presence of more or less abundant mucus in the homogenate, depending on the species, interferes with the procedure of differential centrifugation for the isolation of mitochondria. We observed that this results in the partial contamination of the isolate with other sub-cellular components in variable proportion among bivalve species.

Larsen et al. (2012) also found that the activity of complex IV (which is not involved in the formation of ROS) revealed the best biomarker of OXPHOS capacity. For this

reason, we further normalized the hydrogen peroxide production rate with this biomarker for *M. Arenaria* and *A. islandica*. Moreover, Hulbert, Turner, et al. (2006) showed much larger interspecific differences in mitochondrial respiration when results were normalized with mg of mitochondrial protein than with different biomarker of mitochondrial content.

A.1.5 Oxygen consumption

A first sequence was initiated in forward electron flow in the presence of glutamate (24 mM) and malate (10 mM). Successive additions of ADP (5 mM), Cyt_c (50 μ M), and FCCP (1.5 μ M) allowed measurements of state 3, mitochondrial integrity (state 3 + C), and ETS max (as a proxy of CI max), respectively. Antimycin A (1 μ M), rotenone (1 μ M), and SHAM (1 μ M), were then added to measure the residual oxygen consumption (ROX) in order to correct oxygen respiration rates. Subsequently, complex IV max was measured after addition of ascorbate (2 mM) and tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD, 0.5 mM). See figure A.1 below for an example of such sequence.

A second sequence aimed at measuring AOX activity was initiated in convergent electron flow, i.e., in the presence of glutamate (24 mM), malate (10 mM), and succinate (10 mM). To recruit the AOX activity, the PO_2 inside the chambers was manipulated by temporarily raising the stoppers and introducing nitrogen or oxygen as needed. Both state 2 (substrates only) and state 3 (addition of 5 mM ADP) were measured at a PO_2 below (8.6 kPa) and above (47.5 kPa) the air saturation of the respiration buffer (21.33 kPa), which allowed the calculation of the percent increase in oxygen consumption corresponding to the recruitment of AOX at high PO_2 (Tschischka et al. 2000). To measure the maximal AOX activity, the sequence was terminated at high PO_2 (47.5 kPa) by the addition of antimycin A (2.5 μ M) followed by SHAM (2.5 μ M) after a period of equilibration. In these conditions, the oxygen consumption inhibited by SHAM (absolute decrease after addition of SHAM)

represents the AOX activity. Preliminary titration experiments revealed that 1.5 μM of FCCP resulted in the greatest rate of oxygen consumption (uncoupling) in the presence of glutamate and malate while further addition slightly decreased it. We thus used this concentration to achieve complete uncoupling of the ETS (ETS max).

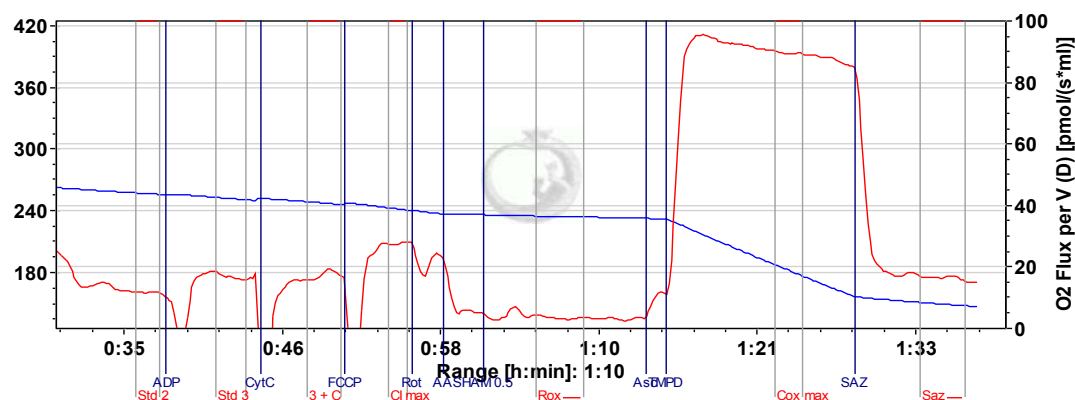


Figure A.1 Example of a substrate-uncoupler-inhibitor-titration used for the acquisition of oxygen consumption data. The sequence was initiated by addition of mitochondria to the chamber already containing glutamate and malate (not annotated). The blue line refers to the left axis (O_2 concentration), and the red line refers to consumption (integrated O_2 concentration on time). Rot = rotenone, AA = antimycin A, SHAM = Acide salicylhydroxamique, Asc = ascorbate, TMPD = N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride, CI max = maximal uncoupled respiration using substrates for complex I, Cox max = maximal oxygen consumption by the Cytochrome C oxidase (after correction for the autoxidation of TMPD and ascorbate, taken from minute 8 after addition of substrates), SAZ = sodium azide. Corrections for residual oxygen consumption are made by subtraction of the Rox period red line value. Corrections for the autoxidation of TMPD and ascorbate are made by subtracting the Saz period red line value

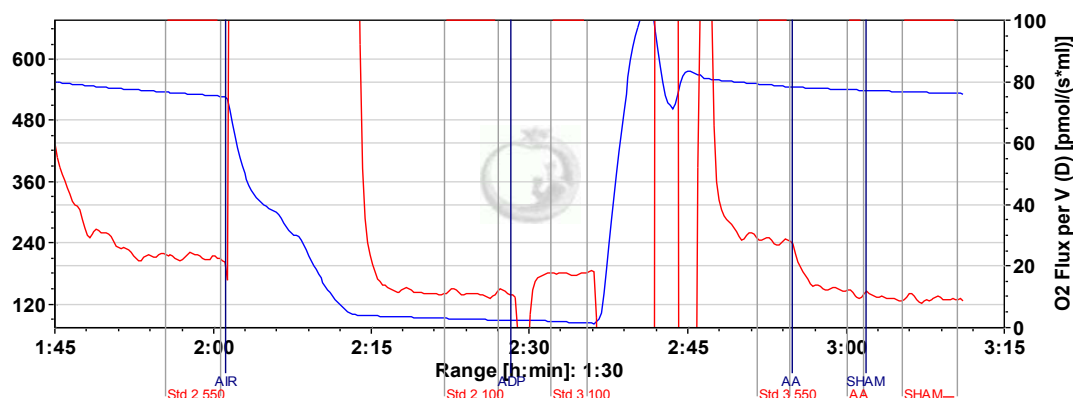


Figure A.2 Example of a substrate-uncoupler-inhibitor-titration used for measuring of AOX activity. The sequence was initiated by addition of mitochondria to the chambers medium already containing glutamate, malate and succinate (not indicated). See fig. A.1 for information on line color code and abbreviations. Std x = state x, AIR = chamber stopper was removed and gas (nitrogen or oxygen) was injected to manipulate oxygen partial pressure. State 2 and 3 (without and with ADP) have been measured at ca 550 and 100 nmol O₂; it is expected that higher O₂ concentrations would recruit maximal AOX activity.

A.1.6 Calculation of % free-radical leak (%FRL)

Free-radical leak can be expressed as percent of electron which leak out of sequence (normal flow in the ETS) producing superoxide and subsequently hydrogen peroxide. It can also be expressed as the percent of oxygen univalently reduced to superoxide; we chose this second metric for the purpose of the present contribution. Calculations are based on the stoichiometric approximation of two moles of oxygen that are univalently reduced to two moles of superoxide. The subsequent dismutation releases one mole of H₂O₂ and one mole of oxygen in the reaction $2\text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ \rightarrow 1\text{H}_2\text{O}_2 + 1\text{O}_2$ (Keller et al. 2004). The net outcome is one mole of oxygen consumed per mole of H₂O₂ produced.

A.1.7 Enzymatic activity

To standardize the presentation of the results, the activities of the enzymes of the electrons transport system are presented as mole of electrons transferred. Therefore, we multiplied the activity calculated as mole of product formed by the number of electrons accepted for final reduction of the electron acceptor used in the assay i.e. two for DCPIP (complex I and II assays), two for INT (ETS assay), and four for oxygen (complex IV assay). Citrate synthase activity was used to normalize the other enzymatic activities and its activity is calculated per mole of product formed. Assay conditions are described below.

Citrate synthase (EC 4.1.3.7)

Reaction medium: 100 mM imidazole-HCl, 0.1 mM DTNB, 0.1 mM acetyl CoA, 0.15 mM oxaloacetate (omitted for the control), pH 8.0. The reaction medium was stabilized for five min, then 80 μ g of mitochondrial proteins were added (final volume 1 ml). Activity was determined by following the increase in absorbance (reduction of DTNB) at 412 nm ($\epsilon_{412} = 13.6 \text{ ml.cm}^{-1}.\mu\text{mol}^{-1}$) for 4 min (Thibault et al. 1997).

Complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase, EC 1.6.5.3)

Reaction medium: 100 mM imidazole, 5 mM MgCl_2 , 2.5 mg.ml^{-1} bovine serum albumine, 0.14 mM NADH, 65 μ M ubiquinone₁, 50 μ M 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP), 4 μ M antimycin A, 10 mM sodium azide, pH 8.0. The mitochondrial suspension (200 μ g proteins) was incubated in the reaction mixture (final volume 1 ml) for 10 min at room temperature followed by 10 min at 10°C. NADH was then added and the activity was determined by following the decrease in absorbance (reduction of DCIP) at 600 nm ($\epsilon_{600} = 19.1 \text{ ml.cm}^{-1}.\mu\text{mol}^{-1}$)

for 5 min. The rotenone-insensitive rate was subtracted from the activity. Adapted from Lemieux et al. (2010).

Complex II (succinate: ubiquinone oxidoreductase, EC 1.3.5.1)

Reaction medium: 100 mM imidazole, 5 mM MgCl_2 , 20 mM succinate, 4 μM antimycin A, 2 μM rotenone, 10 mM sodium azide, 50 μM DCPIP, 65 μM ubiquinone₁ (omitted from the blank), pH 8.0. Mitochondria (140 μg of proteins, final volume 1 ml) were pre-incubated for 5 min at 10°C in the imidazole, MgCl_2 , and succinate solution. Afterwards, inhibitors, DCPIP, and ubiquinone₁ were added and the activity was determined by following the decrease in DCPIP absorbance at 600 nm ($\epsilon_{600} = 19.1 \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$) for 5 min. Adapted from Lemieux et al. (2010).

Electron transport system (ETS assay combining complexes I and III)

Reaction medium: 100 mM imidazole-HCl, 0.85 mM NADH, 2 mM iodonitrotetrazolium chloride (INT), 0.03% Triton X-100, pH 8.0. The mitochondrial suspension (140 μg of mitochondrial proteins) was added to the reaction medium (final volume 1 ml) and activity was determined by following the increase in absorbance (reduction of INT) at 490 nm ($\epsilon_{490} = 15.9 \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$) for 3 min. Adapted from Hébert Chatelain et al. (2008).

Complex IV (cytochrome c oxidase, EC 1.9.3.1)

Respiration medium: 30 mM HEPES, 130 mM KCl, 10 mM KH_2PO_4 , 20 mM glucose, 11 mM MgCl_2 hexahydrate, 0.5% BSA, pH 7.4. Mitochondria (80 μl ; approximately 500 μg of mitochondrial proteins) were added to the chambers of an oxygraph Oxyg 32 (Hansatech Instruments, Ltd, Pentney, Norfolk, UK) containing 920 μl of respiration medium. After equilibration of the oxygen consumption rate, rotenone (1 μM) and antimycin A (3 μM) were added to inhibit the activity of complexes I and III, and ADP (0.8 mM) and cytochrome c (50 μM) were added to

activate complex IV or to remove the potential inhibition by ATP. TMPD (1 mM) and ascorbate (5 mM) were added to initiate the activity, and the decrease in oxygen concentration was read for 4 min after which sodium azide (10 mM) was added to stop the reaction. Chemical background controls due to autoxidation of TMPD, ascorbate, and cytochrome c were subtracted from the activity (Pichaud et al. 2010).

A.2 Statistical analysis

Table A.1 Parameters of statistical test (ANOVA and GLMM) that preceded the post hoc test used to produce *P*-values presented in the figures of the article.

Data set	Test used	<i>F</i> -ratio (or <i>t</i> value)	Df (level; error)	<i>P</i> -value	Variable transformation
Comparison among species					
<i>H₂O₂ production</i>					
Succinate	ANOVA	35.81	2; 25	<0.0001	None
+ ADP	ANOVA	157.61	2; 24	<0.0001	None
+ Antimycin + Oligomycin	ANOVA	39.77	2; 23	<0.0001	None
Glutamate + malate	ANOVA	19.59	2; 24	<0.0001	Log ₁₀
+ succinate	ANOVA	25.99	2; 24	<0.0001	Log ₁₀
+ ADP	ANOVA	87.99	2; 24	<0.0001	Log ₁₀
<i>Free-radical leak</i>					
State 2	ANOVA	7.56	2; 19	=0.0038	None
State 3	ANOVA	10.89	2; 19	=0.0007	None
Comparison among conditions					
<i>H₂O₂ production</i>					
Species	GLMM	54.86	2; 22	<0.0001	None
Condition		149.10	5; 116	<0.0001	
Species*condition		25.23	10; 116	<0.0001	

ANNEXE B

SUPPORTING INFORMATION – CHAPITRE II

B.1 Origin and care of molluscs

All individuals used in this study are from populations located within a narrow latitudinal range in the provinces of Quebec and New Brunswick, Canada. *A. islandica* and *S. solidissima* were purchased from a professional diver in the Îles-de-la-Madeleine, Quebec (47°23'N 61°57'W); *M. polynyma* were purchased from a fisherman in Forestville, Quebec (48°38'N 69°02'W); *M. mercenaria* were purchased from a fisherman in Neguac, New Brunswick (47°15'N 65°03'W); and *M. arenaria* were gathered by hand in Bic, Quebec (48°23'N 68°40'W). Bivalves were all obtained during summer 2009 and kept at the ISMER marine research station in Rimouski, Québec, Canada, in an open flow-through, two-tank system with a 20 cm layer of fine sand on the bottom. The tanks were supplied with sea water (salinity 29) pumped from the St. Lawrence River, the temperature of which fluctuates between 3.5 and 12°C over the year. In addition to the natural phytoplankton remaining in the semi-filtred (50 µm) water of the station, bivalves were fed a live microalgal diet (*Nannochloropsis* sp., *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*; 12%–44%–44% in cell numbers) at 1% body mass/d following a Q₁₀ of 2.5 adjusted at 8°C between April and December.

B.2 Isolation of mitochondria and mitochondria-free cellular debris

Bivalves were sampled between late December 2009 and April 2010, after water temperature in the tanks had stabilized at 4°C. Gills were removed, rinsed with saline water, and maintained at 4°C while being thoroughly minced with a razor blade. Homogenization was achieved using three passes of a loose-fitting pre-cooled glass/teflon pestle in six parts ice-cold homogenization buffer (480 mM sucrose, 230 mM KCl, 30 mM Hepes, 6 mM EGTA, 3 mM EDTA, 1 µg/mL aprotinin, and 1% W/V fatty-acid-free BSA, pH 7.2). The homogenate was centrifuged at 1 250 g for 10 min and the supernatant was removed and conserved. The pellet was resuspended in 15 mL homogenization buffer and centrifuged at 1 000 g for 10 min; this second supernatant was removed and the final pellet of cellular debris was conserved. The two supernatants were combined and a first centrifugation was run at 1 250 g for 10 min to eliminate residual debris. The final supernatant was considered free of unbroken cells or cell debris and was centrifuged at 10 500 g for 15 min. The final mitochondrial pellet was resuspended in 150 µL of homogenization buffer. All centrifugation steps were carried out at 4°C.

Mitochondria and cellular debris were held at -80°C after nitrogen flush and until lipid extraction. We compared the abundance of mitochondrial electron transport systems in both biological fractions (mitochondrial pellet and cell debris) using the NADH-INT (iodonitrotetrazolium) oxidoreduction assay, which targets complexes I and III. Briefly, 100 µL of the biological fraction is added to the reaction medium (0.03% triton-X, 0.85 mM NADH, and 2 mM INT in 0.094 M phosphate buffer, pH 8.5), and the oxidation of INT is measured by following the increase in absorbance at 490 nm (coefficient of extinction = 15.9) after NADH addition. Cell debris always provided values of mitochondrial abundance that were below 1/20 and usually around 1/100 (or no signal) of those obtained for the mitochondrial pellet. We thus consider the cell debris to be essentially devoid of mitochondria and to represent other cell membranes.

B.3 Lipid analysis

Total lipids were extracted from mitochondria (or cell debris) in two parts dichloromethane (Cequier-Sanchez et al. 2008) and one part methanol using a pre-cooled glass/glass hand-operated Potter-Elvehjem homogenizer. The organic phase was evaporated to 500 μ L and polar lipids were separated on silica gel (60, mesh 150–230) microcolumns deactivated with 5% W/W water. Polar lipids (glycerophospholipids) were trans-methylated using 10% boron trifluoride – methanol (SUPELCO, Bf₃-MeOH) at 90°C for 45 min followed by the addition of NaOH to elevate the pH value in order to avoid the partial reversal of dimethyl acetals (DMA) to their corresponding aldehydes (Morrison & Smith 1964). All solvents used were ultra pure grade.

The resulting fatty acid methyl esters (FAME) and DMA were recovered in hexanes and analyzed by GC-MS (GC: AGILENT 6850 series II; MS: AGILENT 5975 B) using a column with a high polarity stationary phase (HP-88 60 m, 0.25 mm \times 0.20 μ m) and the MS at EI mode 70eV. Calibration of the system was performed using regular FA mix standards (SUPELCO 37 FAME), marine FA standards (SUPELCO), and DMA standards (SIGMA). Non-methylene interrupted FA (NMI) share a common molecular ion and similar mass spectra with methylene-interrupted FA of similar chain lengths and unsaturations. However, they differ in retention time, and the two isoforms of each chain length known to be predominant in marine bivalves (Kraffe et al. 2004; Barnathan 2009) migrate very closely to one another; their successful resolution requires the use of a long polar column phase. DMA can easily be distinguished from FAME by the strong dominance of the McLafferty rearrangement ion at $M/Z=75$. For all DMA, we were able to observe the ion at $[M-31]^+$, corresponding to the loss of a methoxyl that is also characteristic of DMA (Maulik et al. 1993) and gives information on the chain length and the rare presence

of a single double bond on the carbon chain. Since triglycerids were eliminated from the analysis and only glycerophospholipids were subjected to methylation, the percentage of plasmalogens among glycerophospholipids is simply double the percentage of DMA among the total of DMA and FAME. To verify that there was no bias concerning the quantification of DMA in our method, we subjected a standard of the pure plasmalogen PE (AVANTI lipid) to the trans-methylation and analysis protocol (five replicates). We found a mean ratio between the molar percentage of FAME and DMA of 0.97, which is very close to one and was considered satisfactory.

The peroxidation index (PI) is calculated as $PI = (0.025 \times \% \text{ monoenoics}) + (0.258 \times \% 20:2 \text{ NMI}) + (0.32 \times \% 22:2 \text{ NMI}) + (1 \times \% \text{ dienoics}) + (2 \times \% \text{ trienoics}) + (4 \times \% \text{ tetraenoics}) + (6 \times \% \text{ pentaenoics}) + (8 \times \% \text{ hexaenoics})$, including a single case of DMA among monoenes. Individual peroxidation index values for NMI are estimated from Kaneniwa et al. (1988).

B.4 Statistics

Significant effects ($\alpha = 0.05$) were determined by ANOVA conducted using the JMP v8.0 statistical package (SAS Institute Inc.). Where ANOVA revealed a significant effect, Tukey-Kramer HSD was used to provide P-values for the differences among species. Homogeneity of variance was estimated using the Brown-Forsythe test and variables were \log_{10} transformed when necessary. Results are presented as means \pm SEM.

ANNEXE C

SUPPORTING INFORMATION – CHAPITRE III

Table C.1 Parameters of statistical test (ANCOVA and ANOVA) that preceded the test of the effect of covariates or post hoc test used to produce *P*-values presented in the figures.

Analysis	Test used	<i>F</i> -ratio	Df (level; error)	<i>P</i> -value
Effect of age on pentaenes	ANCOVA			
Age*fraction		0.014	1;34	0.905
Age – global effect		19.26	2;35	<0.0001
Effect of age on DHA				
Age*fraction		0.001	1;34	0.977
Age – global effect		7.39	2;35	0.002
Effect of age on NMI				
Age*fraction		0.106	1;34	0.747
Age – global effect		11.38	2;35	0.0002
Effect of age, wet weight and length on PI				

Age*fraction	0.01	1; 34	0.915
Age – global effect	13.76	2; 35	<0.0001
Wet weight*fraction	0.63	1; 34	0.435
Wet weight – global effect	13.38	2; 35	<0.0001
Length*fraction	0.44	1; 34	0.511
Length – global effect	13.73	2; 35	<0.0001
Effect of supplementation on various markers of lipid composition	ANOVA	7; 71	
PI – global effect	59.96		<0.0001
Pentaenes – global effect	69.46		<0.0001
DHA – global effect	28.84		<0.0001
NMI – global effect	111.26		<0.0001
DMA – global effect	18.97		<0.0001
Branched chains – global effect	49.99		<0.0001
Detailed effects of supplementation on PI	ANOVA	1; 71	
Species*fraction*Supp	0.03		0.858
Species*fraction	2.50		0.118
Species *Supp	1.25		0.266
Fraction*Supp	1.50		0.224
Supp	78.17		<0.0001
Fraction	13.88		0.0004
Species	159.62		<0.0001
Effect of temperature on	ANOVA	7; 57	

various markers of lipid composition		
PI – global effect	22.65	<0.0001
Pentaenes – global effect	19.77	<0.0001
DHA – global effect	8.35	<0.0001
CFI – global effect	10.73	<0.0001
NMI – global effect	67.02	<0.0001
DMA – global effect	13.89	<0.0001
Detailed effects of	ANOVA	1; 57
temperature on PI		
Species*fraction*season	0.47	0.494
Species*fraction	4.84	0.032
Species *season	0.15	0.702
Fraction*season	3.81	0.071
season	1.89	0.175
Fraction	0.09	0.761
Species	148.51	<0.0001

RÉFÉRENCES

- Abbott SK, Else PL & Hulbert AJ (2010) Membrane fatty acid composition of rat skeletal muscle is most responsive to the balance of dietary n-3 and n-6 PUFA. *Br. J. Nutr.* 103, 522–529.
- Abele D, Brey T & Philipp E (2009) Bivalve models of aging and the determination of molluscan lifespans. *Exp. Gerontol.* 44, 307–315.
- Abele D, Heise K, Portner HO & Puntarulo S (2002) Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *J. Exp. Biol.* 205, 1831–1841.
- Abele D, Philipp E, Gonzalez PM & Puntarulo S (2007) Marine invertebrate mitochondria and oxidative stress. *Front. Biosci.* 12, 933–946.
- Abele D & Puntarulo S (2004) Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol. a-Molecular Integr. Physiol.* 138, 405–415.
- Abele D, Strahl J, Brey T & Philipp EER (2008) Imperceptible senescence: Ageing in the ocean quahog *Arctica islandica*. *Free Radic. Res.* 42, 474–480.
- Ansell AD (1964) Some parameters of growth of mature *Venus mercenaria* L. *J. Cons. Int. Explor. Mer* 29, 214–220.
- Ansell AD (1968) The rate of growth of the Hard clam *Mercenaria mercenaria* (L) throughout the geographical range. *J. Cons. Int. Explor. Mer* 31, 364–409.
- Ayala V, Naudi A, Sanz A, Caro P, Portero-Otin M, Barja G & Pamplona R (2007) Dietary protein restriction decreases oxidative protein damage, peroxidizability index, and mitochondrial complex I content in rat liver. *Journals Gerontol. Ser. a-Biological Sci. Med. Sci.* 62, 352–360.
- Barata C, Navarro JC, Varo I, Riva MC, Arun S & Porte C (2005) Changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in *Daphnia magna* during the aging process. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochemistry Mol. Biol.* 140, 81–90.

- Bardach JE, Ryther JH & McLarney WO (1972) *Aquaculture. The farming and husbandry of freshwater and marine organisms*, London: John Wiley & Sons, Inc.
- Barja G (2004) Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biol. Rev.* 79, 235–251.
- Barja G (1999) Mitochondrial oxygen radical generation and leak: Sites of production in state 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31, 347–366.
- Barja G (2000) The flux of free radical attack through mitochondrial DNA is related to aging rate. *Aging-Clinical Exp. Res.* 12, 342–355.
- Barja G (2013) Updating the Mitochondrial Free Radical Theory of Aging: An Integrated View, Key Aspects, and Confounding Concepts. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 1420–1445.
- Barja G, Cadenas S, Rojas C, Perezcampo R & Lopeztorres M (1994) Low mitochondrial free-radical production per unit O₂ consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic-rate in birds. *Free Radic. Res.* 21, 317–327.
- Barja G & Herrero A (1998) Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon. *J. Bioenerg. Biomembr.* 30, 235–243.
- Barnathan G (2009) Non-methylene-interrupted fatty acids from marine invertebrates: Occurrence, characterization and biological properties. *Biochimie* 91, 671–678.
- Basova L, Begum S, Strahl J, Sukhotin A, Brey T, Philipp E & Abele D (2012) Age-dependent patterns of antioxidants in *Arctica islandica* from six regionally separate populations with different lifespans. *Aquat. Biol.* 14, 141–152.
- Bird SS, Marur VR, Sniatynski MJ, Greenberg HK & Kristal BS (2011) Lipidomics profiling by high-resolution LC-MS and high-energy collisional dissociation fragmentation: focus on characterization of mitochondrial cardiolipins and monolysocardiolipins. *Anal. Chem.* 83, 940–9.
- Bodnar AG (2009) Marine invertebrates as models for aging research. *Exp. Gerontol.* 44, 477–484.

- Borg DC (1993) Oxygen free radicals and tissue injury, A reference outline. In M. Tarr & F. Samson, eds. *Oxygen free radicals in tissue damage*. Boston: Birkhäuser, pp.12–53.
- Brand MD (2010) The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol.* 45, 466–472.
- Bricelj VM, Ouellette C, Anderson M, Brun NT, Pernet F, Ross NW & Landry T (2006) *Physiological and biochemical responses of juvenile quahogs, mercenaria mercenaria, to low temperatures: potential for mitigation of overwintering mortalities*, Can. Tech. Rep. Fish. Aqua. Sci. 2739 : vii + 47 p.
- Brousseau DJ (1979) Analysis of growth rate in *Mya arenaria* using the Von Bertalanffy equation. *Mar. Biol.* 51, 221–227.
- Brown JCL, McClelland GB, Faure P a, Klaiman JM & Staples JF (2009) Examining the mechanisms responsible for lower ROS release rates in liver mitochondria from the long-lived house sparrow (*Passer domesticus*) and big brown bat (*Eptesicus fuscus*) compared to the short-lived mouse (*Mus musculus*). *Mech. Ageing Dev.* 130, 467–76.
- Brown MF & Stuart JA (2007) Correlation of mitochondrial superoxide dismutase and DNA polymerase beta in mammalian dermal fibroblasts with species maximal lifespan. *Mech. Ageing Dev.* 128, 696–705.
- Brulotte S & Giguère M (2007) *Reproduction et taille à la maturité sexuelle de la Mye commune (Mya arenaria) au Québec*, Rapp. tech. can. sci. halieut. aquat. 2698 : viii + 40 p.
- Brunet-Rossinni A k (2004a) testing the free-radical theory of aging in bats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1019, 506–508.
- Brunet-Rossinni AK (2004b) Reduced free-radical production and extreme longevity in the little brown bat (*Myotis lucifugus*) versus two non-flying mammals. *Mech. Ageing Dev.* 125, 11–20.
- Bueno AA, Ghebremeskel K, Bakheit KH, Elbashir MI & Adam I (2012) Dimethyl acetals, an indirect marker of the endogenous antioxidant plasmalogen level, are reduced in blood lipids of Sudanese pre-eclamptic subjects whose background diet is high in carbohydrate. *J. Obstet. Gynaecol.* 32, 241–6.
- Buffenstein R, Edrey YH, Yang T & Mele J (2008) The oxidative stress theory of aging: embattled or invincible? Insights from non-traditional model organisms. *Age (Omaha)*. 30, 99–109.

- Butler PG, Wanamaker AD, Scourse JD, Richardson CA & Reynolds DJ (2013) Variability of marine climate on the North Icelandic Shelf in a 1357-year proxy archive based on growth increments in the bivalve *Arctica islandica*. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 373, 141–151.
- Buttemer W a., Abele D & Costantini D (2010a) From bivalves to birds: oxidative stress and longevity. *Funct. Ecol.* 24, 971–983.
- Buttemer WA, Abele D & Costantini D (2010b) From bivalves to birds: oxidative stress and longevity. *Funct. Ecol.* 24, 971–983.
- Buttemer WA, Battam H & Hulbert AJ (2008) Fowl play and the price of petrel: long-living Procellariiformes have peroxidation-resistant membrane composition compared with short-living Galliformes. *Biol. Lett.* 4, 351–354.
- Bychek E & Gushchina I (1999) Age-dependent changes of lipid composition in *Daphnia magna*. *Biochemistry-Moscow* 64, 543–545.
- Caro P, Gomez J, Lopez-Torres M, Sanchez I, Naudi A, Jove M, Pamplona R & Barja G (2008) Forty percent and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology* 9, 183–196.
- Cequier-Sanchez E, Rodriguez C, Ravelo AG & Zarate R (2008) Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures. *J. Agric. Food Chem.* 56, 4297–4303.
- Chicco AJ & Sparagna GC (2007) Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *Am. J. Physiol. Physiol.* 292, C33–C44.
- Choi JH, Kim JI, Kim DW, Moon YS, Chung HY & Yu BP (1996) Analysis of lipid composition and hydroxyl radicals in brain membranes of senescence-accelerated mice. *Age (Omaha)*. 19, 1–5.
- Contreras F-X, Ernst AM, Wieland F & Brügger B (2011) Specificity of intramembrane protein-lipid interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, 1–18.
- Coolbear K, Berde C & Keough K (1983) Gel to liquid-crystalline phase transitions of aqueous dispersions of polyunsaturated mixed-acid phosphatidylcholines. *Biochemistry* 22, 1466–1473.
- Correia AD, Costa MH, Luis OJ & Livingstone DR (2003) Age-related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 289, 83–101.

- Couture P & Hulbert AJ (1995) Membrane fatty-acid composition of tissues is related to body-mass of mammals. *J. Membr. Biol.* 148, 27–39.
- Csiszar A, Labinskyy N, Zhao XM, Hu FR, Serpillon S, Huang ZS, Ballabh P, Levy RJ, Hintze TH, Wolin MS, Austad SN, Podlutzky A & Ungvari Z (2007) Vascular superoxide and hydrogen peroxide production and oxidative stress resistance in two closely related rodent species with disparate longevity. *Aging Cell* 6, 783–797.
- Dahlgren TG, Weinberg JR & Halanych KM (2000) Phylogeography of the ocean quahog (*Arctica islandica*): influences of paleoclimate on genetic diversity and species range. *Mar. Biol.* 137, 487–495.
- Dańko MJ, Kozłowski J, Vaupel JW & Baudisch A (2012) Mutation accumulation may be a minor force in shaping life history traits. *PLoS One* 7, e34146.
- Donaghy L, Kraffe E, Le Goïc N, Lambert C, Volety AK & Soudant P (2012) Reactive oxygen species in unstimulated hemocytes of the pacific oyster *Crassostrea gigas*: a mitochondrial involvement. *PLoS One* 7, e46594.
- Van Dongen JT, Gupta KJ, Ramírez-Aguilar SJ, Araújo WL, Nunes-Nesi A & Fernie AR (2011) Regulation of respiration in plants: a role for alternative metabolic pathways. *J. Plant Physiol.* 168, 1434–43.
- Else PL & Hulbert AJ (2003) Membranes as metabolic pacemakers. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 30, 559–564.
- Engelmann B (2004) Plasmalogens: targets for oxidants and major lipophilic antioxidants. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 147–150.
- Fannin SW, Lesnefsky EJ, Slabe TJ, Hassan MO & Hoppel CL (1999) Aging selectively decreases oxidative capacity in rat heart interfibrillar mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 372, 399–407.
- Farkas T (1979) Adaptation of fatty acid compositions to temperature—a study on planktonic crustaceans. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* 64, 71–76.
- Farkas T, Nemecz C & Csengeri I (1982) Differential Response of Lipid Metabolism and Membrane Physical State by an Actively and Passively Overwintering Planktonic Crustacean. *Lipids* 19, 436–442.
- Farooqui AA & Horrocks LA (2001) Plasmalogens: Workhorse lipids of membranes in normal and injured neurons and glia. *Neuroscientist* 7, 232–245.

- French AR (2000) Interdependency of stored food and changes in body temperature during hibernation of the eastern chipmunk, *Tamias striatus*. *J. Mammal.* 81, 979–985.
- Garland T & Adolph SC (1994) Why not to do two-species comparative-studies - limitations on inferring adaptation. *Physiol. Zool.* 67, 797–828.
- Garland T, Bennett AF & Rezende EL (2005) Phylogenetic approaches in comparative physiology. *J. Exp. Biol.* 208, 3015–35.
- Garland T, Midford PE & Ives AR (1999) An introduction to phylogenetically based statistical methods, with a new method for confidence intervals on ancestral values. *Am. Zool.* 39, 374–388.
- Geiser F (1998) Evolution of Daily Torpor and Hibernation in Birds and Mammals - Importance of Body Size. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 25, 736–739.
- Geiser F (1988) Reduction of metabolism during hibernation and daily torpor in mammals and birds: temperature effect or physiological inhibition? *J. Comp. Physiol. B* 158, 25–37.
- Geiser F & Ruf T (1995) Hibernation versus daily torpor in mammals and birds - physiological variables and classification of torpor patterns [Review]. *Physiol. Zool.* 68, 935–966.
- Giguère M, Brulotte S & Hartog F (2007) *Évaluation de quelques gisements de Mye commune (Mya arenaria) de la rive sud de l'estuaire du Saint-Laurent en 2005 et 2006*, Rapp tech can sci halieut aquat. 2738 : xi + 107 p.
- Giguère M, Brulotte S & Paille N (2005) *Mise à jour des connaissances sur la biologie et l'exploitation de la Mactre de l'Atlantique (Spisula solidissima) aux Îles-de-la-Madeleine Rapport technique canadien des sciences halieutiques et aquatiques 2587*, Rapp. tech. can. sci. halieut. aquat. 2587 : ix + 32 p.
- Gillis TE & Ballantyne JS (1999) Influences of subzero thermal acclimation on mitochondrial membrane composition of temperate zone marine bivalve mollusks. *Lipids* 34, 59–66.
- Gnaiger E (2009) Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle New perspectives of mitochondrial physiology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1837–1845.
- Gredilla R, Barja G & Lopez-Torres M (2001) Effect of short-term caloric restriction on H₂O₂ production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria and location of the free radical source. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33, 279–287.

- Grimm MOW, Kuchenbecker J, Rothhaar TL, Grosgen S, Hundsdorfer B, Burg VK, Friess P, Muller U, Grimm HS, Riemenschneider M & Hartmann T (2011) Plasmalogen synthesis is regulated via alkyl-dihydroxyacetonephosphate-synthase by amyloid precursor protein processing and is affected in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 116, 916–925.
- Grizzle RE, Bricelj VM & Shumway SE (2001) Physiological ecology of *Mercenaria mercenaria*. In J. N. Kraeuter & M. Castagna, eds. *Biology of the Hard clam*. Amsterdam: Elsevier, pp.305–382.
- Grossfield A, Feller SE & Pitman MC (2006) A role for direct interactions in the modulation of rhodopsin by omega-3 polyunsaturated lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4888–93.
- Haag WR & Rypel AL (2011) Growth and longevity in freshwater mussels: evolutionary and conservation implications. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 86, 225–47.
- Haddad LS, Kelbert L & Hulbert AJ (2007) Extended longevity of queen honey bees compared to workers is associated with peroxidation-resistant membranes. *Exp. Gerontol.* 42, 601–609.
- Hall JM, Parrish CC & Thompson RJ (2002) Eicosapentaenoic acid regulates scallop (*Placopecten magellanicus*) membrane fluidity in response to cold. *Biol. Bull.* 202, 201–203.
- Halliwell B & Gutteridge JMC (1999) *Free radicals in biology and medicine*, New York: Oxford University Press.
- Hamwi A & Haskin HH (1969) Oxygen consumption and pumping rate in the hard clam *Mercenaria mercenaria*: a direct method. *Science.* 163, 823–824.
- Harman D (1956) Aging: a theory base on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11, 298–300.
- Hazel JR (1995) Thermal adaptation in biological membranes - is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu. Rev. Physiol.* 57, 19–42.
- Hazel JR & Landrey S (1988) Time course of thermal adaptation in plasma membranes of trout kidney. I. Headgroup composition. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 255, R622–R627.
- Hazel JR & Williams EE (1990) The role of alterations in membrane lipid-composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical-environment. *Prog. Lipid Res.* 29, 167–227.

- Hébert Chatelain E, Breton S, Lemieux H & Blier PU (2008) Epitoky in *Nereis* (Neanthes) *virens* (Polychaeta: Nereididae): a story about sex and death. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 149, 202–208.
- Herrero A & Barja G (1997a) ADP-regulation of mitochondrial free radical production is different with complex I- or complex II-linked substrates: Implications for the exercise paradox and brain hypermetabolism. *J. Bioenerg. Biomembr.* 29, 241–249.
- Herrero A & Barja G (2001) Effect of aging on mitochondrial and nuclear DNA oxidative damage in the heart and brain throughout the life-span of the rat. *J. Am. Aging Assoc.* 24, 45–50.
- Herrero A & Barja G (1998) H₂O₂ production of heart mitochondria and aging rate are slower in canaries and parakeets than in mice: sites of free radical generation and mechanisms involved. *Mech. Ageing Dev.* 103, 133–146.
- Herrero A & Barja G (2000) Localization of the site of oxygen radical generation inside the complex I of heart and nonsynaptic brain mammalian mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32, 609–615.
- Herrero A & Barja G (1997b) Sites and mechanisms responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon. *Mech. Ageing Dev.* 98, 95–111.
- Herrero A, Portero-Otin M, Bellmunt MJ, Pamplona R & Barja G (2001) Effect of the degree of fatty acid unsaturation of rat heart mitochondria on their rates of H₂O₂ production and lipid and protein oxidative damage. *Mech. Ageing Dev.* 122, 427–443.
- Hiona A, Sanz A, Kujoth GC, Pamplona R, Seo AY, Hofer T, Someya S, Miyakawa T, Nakayama C, Samhan-Arias AK, Servais S, Barger JL, Portero-Otin M, Tanokura M, Prolla T a & Leeuwenburgh C (2010) Mitochondrial DNA mutations induce mitochondrial dysfunction, apoptosis and sarcopenia in skeletal muscle of mitochondrial DNA mutator mice. *PLoS One* 5, e11468.
- Hirst J, King MS & Pryde KR (2008) The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 976–980.
- Hochachka PW & Somero GN (2002) *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution* Oxford Uni., New York.
- Holman RT (1954) Autoxidation of fats and related substances. In R. T. Holman, W. O. Lundberg, & T. Malkin, eds. *Progress in chemistry of fats and other lipids*. London: Pergamon, pp.51–98.

- Hulbert AJ (2011) Longevity, lipids and *C. elegans*. *Aging-Us* 3, 81–82.
- Hulbert AJ (2010) Metabolism and longevity: Is there a role for membrane fatty acids? *Integr. Comp. Biol.* 50, 808–817.
- Hulbert AJ (2005) On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J. Theor. Biol.* 234, 277–288.
- Hulbert AJ (2008) The links between membrane composition, metabolic rate and lifespan. *Comp. Biochem. Physiol. a-Molecular Integr. Physiol.* 150, 196–203.
- Hulbert AJ, Beard LA & Grigg GC (2008) The exceptional longevity of an egg-laying mammal, the short-beaked echidna (*Tachyglossus aculeatus*) is associated with peroxidation-resistant membrane composition. *Exp. Gerontol.* 43, 729–733.
- Hulbert AJ, Faulks S, Buttemer WA & Else PL (2002) Acyl composition of muscle membranes varies with body size in birds. *J. Exp. Biol.* 205, 3561–3569.
- Hulbert AJ, Faulks SC & Buffenstein R (2006) Oxidation-resistant membrane phospholipids can explain longevity differences among the longest-living rodents and similarly-sized mice. *Journals Gerontol. Ser. a-Biological Sci. Med. Sci.* 61, 1009–1018.
- Hulbert AJ, Kelly MA & Abbott SK (2014) Polyunsaturated fats, membrane lipids and animal longevity. *J. Comp. Physiol. B.* 184, 149–166.
- Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R & Buttemer WA (2007) Life and death: Metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol. Rev.* 87, 1175–1213.
- Hulbert AJ, Rana T & Couture P (2002) The acyl composition of mammalian phospholipids: an allometric analysis. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochemistry Mol. Biol.* 132, 515–527.
- Hulbert AJ, Turner N, Hinde J, Else P & Guderley H (2006) How might you compare mitochondria from different tissues and different species? *J. Comp. Physiol. B-Biochemical Syst. Environ. Physiol.* 176, 93–105.
- Hulbert AJ, Turner N, Storlien LH & Else PL (2005) Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biol. Rev.* 80, 155–169.
- Humphries MM, Kramer DL & Thomas DW (2003) The role of energy availability in Mammalian hibernation: an experimental test in free-ranging Eastern chipmunks. *Physiol. Biochem. Zool.* 76, 180–186.

- Jacobson L, Sutherland S, Burnett J, Davidson M, Harding J, Normant J, Picariello A & Powell E (2006) *Report from the Atlantic Surfclam (Spisula solidissima) Aging Workshop Northeast Fisheries Science Center, Woods Hole, MA, 7-9 November 2005*.
- Kakela R, Mattila M, Hermansson M, Haimi P, Uphoff A, Paajanen V, Somerharju P & Vornanen M (2008) Seasonal acclimatization of brain lipidome in a eurythermal fish (*Carassius carassius*) is mainly determined by temperature. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294, R1716–28.
- Kaneda T (1991) Iso-fatty and anteiso-fatty acids in bacteria - biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol. Rev.* 55, 288–302.
- Kaneniwa M, Miyashita K & Takagi T (1988) Autoxidation rates of 5-olefinic monoenoic and dienoic fatty acids from sea urchin lipids and meadowfoam oils. *J. Am. oil Chem. Soc.* 65, 1470–1474.
- Kawashima H & Ohnishi M (2003) Fatty acid composition of various tissue lipids in the marine bivalves, *Megangulus venulosus* and *Megangulus zyonoensis*, from coastal waters of Hokkaido, northern Japan. *J. Oleo Sci.* 52, 309–315.
- Keller M, Sommer AM, Portner HO & Abele D (2004) Seasonality of energetic functioning and production of reactive oxygen species by lugworm (*Arenicola marina*) mitochondria exposed to acute temperature changes. *J. Exp. Biol.* 207, 2529–2538.
- Khrapko K & Vijg J (2009) Mitochondrial DNA mutations and aging: devils in the details? *Trends Genet.* 25, 91–98.
- Kilada RW, Campana SE & Roddick D (2007) Validated age, growth, and mortality estimates of the ocean quahog (*Arctica islandica*) in the western Atlantic. *Ices J. Mar. Sci.* 64, 31–38.
- Kraeuter JN & Castagna M (2001) *Biology of the Hard clam* J. N. Kraeuter & M. Castagna, eds., Amsterdam: Elsevier Science Bv.
- Kraffe E (2003) *Étude de la spécificité du cardiolipide et des plasmalogènes chez les mollusques bivalves; apport des méthodes chromatographiques*. Brest, France: Université de Bretagne Occidentale.
- Kraffe E, Grall J, Le Duff M, Soudant P & Marty Y (2008) A striking parallel between cardiolipin fatty acid composition and phylogenetic belonging in marine bivalves: A possible adaptative evolution? *Lipids* 43, 961–970.
- Kraffe E, Soudant P & Marty Y (2004) Fatty acids of serine, ethanolamine, and choline plasmalogens in some marine bivalves. *Lipids* 39, 59–66.

- Kraffe E, Soudant P, Marty Y & Kervarec N (2005) Docosahexaenoic acid- and eicosapentaenoic acid-enriched cardiolipin in the manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Lipids* 40, 619–625.
- Kraffe E, Soudant P, Marty Y, Kervarec N & Jehan P (2002) Evidence of a tetradocosaenoic cardiolipin in some marine bivalves. *Lipids* 37, 507–514.
- Ku HH, Brunk UT & Sohal RS (1993) Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen-peroxide production and longevity of mammalian-species. *Free Radic. Biol. Med.* 15, 621–627.
- Ku HH & Sohal RS (1993) Comparison of mitochondrial prooxidant generation and antioxidant defenses between rat and pigeon - possible basis of variation in longevity and metabolic potential. *Mech. Ageing Dev.* 72, 67–76.
- Kuczynski B & Reo N V (2006) Evidence that plasmalogen is protective against oxidative stress in the rat brain. *Neurochem. Res.* 31, 639–656.
- Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, Hofer T, Seo AY, Sullivan R, Jobling WA, Morrow JD, Van Remmen H, Sedivy JM, Yamasoba T, Tanokura M, Weindruch R, Leeuwenburgh C & Prolla TA (2005) Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science*. 309, 481–484.
- Kushnareva Y, Murphy AN & Andreyev A (2002) Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)(+) oxidation-reduction state. *Biochem. J.* 368, 545–553.
- Kuznetsov A V, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R & Kunz WS (2008) Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat. Protoc.* 3, 965–976.
- Kwong LK & Sohal RS (2000) Age-related changes in activities of mitochondrial electron transport complexes in various tissues of the mouse. *Arch. Biochem. Biophys.* 373, 16–22.
- Labinskyy N, Csiszar A, Orosz Z, Smith K, Rivera A, Buffenstein R & Ungvari Z (2006) Comparison of endothelial function, superoxide anion and H₂O₂ production, and vascular oxidative stress resistance between the longest-living rodent, the naked mole rat, and mice. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 291, H2698–H2704.
- Lambert AJ, Boysen HM, Buckingham JA, Yang T, Podlutzky A, Austad SN, Kunz TH, Buffenstein R & Brand MD (2007) Low rates of hydrogen peroxide

- production by isolated heart mitochondria associate with long maximum lifespan in vertebrate homeotherms. *Aging Cell* 6, 607–618.
- Lambert AJ & Brand MD (2004a) Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH : ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Biol. Chem.* 279, 39414–39420.
- Lambert AJ & Brand MD (2004b) Superoxide production by NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochem. J.* 382, 511–517.
- Lambert AJ, Buckingham JA, Boysen HM & Brand MD (2010) Low complex I content explains the low hydrogen peroxide production rate of heart mitochondria from the long-lived pigeon, *Columba livia*. *Aging Cell* 9, 78–91.
- Lambert AJ, Portero-Otin M, Pamplona R & Merry BJ (2004) Effect of ageing and caloric restriction on specific markers of protein oxidative damage and membrane peroxidizability in rat liver mitochondria. *Mech. Ageing Dev.* 125, 529–538.
- Landry T, Sephton TW & Jones DA (1993) Growth and mortality of northern quahog, (linnaeus, 1758) *Mercenaria mercenaria* in Prince-Edward-Island. *J. Shellfish Res.* 12, 321–327.
- Lands WE, Inoue M, Sugiura Y & Okuyama H (1982) Selective incorporation of polyunsaturated fatty acids into phosphatidylcholine by rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 257, 14968–14972.
- Larsen S, Nielsen J, Hansen CN, Nielsen LB, Wibrand F, Stride N, Schroder HD, Boushel R, Helge JW, Dela F & Hey-Mogensen M (2012) Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J. Physiol.* 590, 3349–3360.
- Lemieux H, Tardif J-C, Dutil J-D & Blier PU (2010) Thermal sensitivity of cardiac mitochondrial metabolism in an ectothermic species from a cold environment, Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 384, 113–118.
- Lenaz G & Genova ML (2010) Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: A new understanding of an old subject. *Antioxid. Redox Signal.* 12, 961–1008.
- Lucas-Sánchez a, Almaida-Pagán PF, Madrid J a, de Costa J & Mendiola P (2011) Age-related changes in fatty acid profile and locomotor activity rhythms in *Nothobranchius korthausae*. *Exp. Gerontol.* 46, 970–8.

- Lushchak VI, Semchyshyn HM & Lushchak OV (2012) The classic methods to measure oxidative damage: lipid peroxides, thiobarbituric-acid reactive substances, and protein carbonyls. In D. Abele, J. P. Vazquez-Medina, & T. Zenteno-Savin, eds. *Oxidative stress in aquatic ecosystems*. West Sussex, UK: Wiley-Blackwell, pp.420–431.
- MacDonald BA & Thomas MLH (1980) Age determination of the soft-shell clam *Mya arenaria* using shell internal growth lines. *Mar. Biol.* 58, 105–109.
- Maeba R, Maeda T, Kinoshita M, Takao K, Takenaka H, Kusano J, Yoshimura N, Takeoka Y, Yasuda D, Okazaki T & Teramoto T (2007) Plasmalogens in human serum positively correlate with high-density lipoprotein and decrease with aging. *J. Atheroscler. Thromb.* 14, 12–18.
- De Magalhaes JP & Costa J (2009) A database of vertebrate longevity records and their relation to other life-history traits. *J. Evol. Biol.* 22, 1770–1774.
- Mansouri A, Muller FL, Liu YH, Ng R, Faulkner J, Hamilton M, Richardson A, Huang TT, Epstein CJ & Van Remmen H (2006) Alterations in mitochondrial function, hydrogen peroxide release and oxidative damage in mouse hind-limb skeletal muscle during aging. *Mech. Ageing Dev.* 127, 298–306.
- Maulik N, Bagchi D, Jones R, Cordis G & Das DK (1993) Identification and characterization of plasmalogen fatty-acids in swine heart. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11, 1151–1156.
- Mitchell TW, Buffenstein R & Hulbert AJ (2007) Membrane phospholipid composition may contribute to exceptional longevity of the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*): A comparative study using shotgun lipidomics. *Exp. Gerontol.* 42, 1053–1062.
- Montgomery MK, Hulbert AJ & Buttemer WA (2011) The long life of birds: the rat-pigeon comparison revisited. *PLoS One* 6, e24138.
- Montgomery MK, Hulbert AJ & Buttemer WA (2012) Does the oxidative stress theory of aging explain longevity differences in birds? I. Mitochondrial ROS production. *Exp. Gerontol.* 47, 203–210.
- Morrison WR & Smith LIM (1964) Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.* 5, 600–608.
- Moskovitz J (2005) Methionine sulfoxide reductases: ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1703, 213–219.

- Mourente G & Diaz-Salvago E (1999) Characterization of antioxidant systems , oxidation status and lipids in brain of wild-caught size-class distributed *Aristeus*. *Comp. Biochem. Physiol. - B Comp. Biochem.* 124, 405–416.
- Moyes CD & Ballantyne JS (2011) Membranes and Temperature: Homeoviscous Adaptation. In A. Farrell, ed. *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment*. Elsevier Inc., pp.1725–1731.
- Munro D & Blier PU (2012) The extreme longevity of *Arctica islandica* is associated with increased peroxidation resistance in mitochondrial membranes. *Aging Cell* 11, 845–55.
- Munro D, Thomas DW & Humphries MM (2005) Torpor patterns of hibernating eastern chipmunks *Tamias striatus* vary in response to the size and fatty acid composition of food hoards. *J. Anim. Ecol.* 74, 692–700.
- Nagan N & Zoeller RA (2001) Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog. Lipid Res.* 40, 199–229.
- Naudi A, Caro P, Jove M, Gomez J, Boada J, Ayala V, Portero-Otin M, Barja G & Pamplona R (2007) Methionine restriction decreases endogenous oxidative molecular damage and increases mitochondrial biogenesis and uncoupling protein 4 in rat brain. *Rejuvenation Res.* 10, 473–483.
- Naudi A, Jové M, Ayala V, Portero-Otín M, Barja G & Pamplona R (2011) Regulation of Membrane Unsaturation as Antioxidant Adaptive Mechanism in Long-lived Animal Species. *Free Radicals Antioxidants* 1, 3–12.
- Neretti N, Wang P-Y, Brodsky AS, Nguyen HH, White KP, Rogina B & Helfand SL (2009) Long-lived Indy induces reduced mitochondrial reactive oxygen species production and oxidative damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2277–2282.
- Nevenzel JC, Gibbs A & Benson AA (1985) Plasmalogens in the gill lipids of aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochemistry Mol. Biol.* 82, 293–297.
- Pamplona R (2008) Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: A causal role in aging and longevity. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics* 1777, 1249–1262.
- Pamplona R (2011) Mitochondrial DNA damage in animal longevity: Insights from comparative studies. *J. Aging Res.* 2011, 1–9.
- Pamplona R & Barja G (2011) An evolutionary comparative scan for longevity-related oxidative stress resistance mechanisms in homeotherms. *Biogerontology* 12, 409–435.

- Pamplona R & Barja G (2006) Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: the protein and methionine connection. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 496–508.
- Pamplona R, Portero-Otin M, Requena JR, Thorpe SR, Herrero A & Barja G (1999) A low degree of fatty acid unsaturation leads to lower lipid peroxidation and lipoxidation-derived protein modification in heart mitochondria of the longevous pigeon than in the short-lived rat. *Mech. Ageing Dev.* 106, 283–296.
- Pamplona R, Portero-Otin M, Riba D, Ledo F, Gredilla R, Herrero A & Barja G (1999) Heart fatty acid unsaturation and lipid peroxidation, and aging rate, are lower in the canary and the parakeet than in the mouse. *Aging-Clinical Exp. Res.* 11, 44–49.
- Pamplona R, Portero-Otin M, Riba D, Requena JR, Thorpe SR, Lopez-Torres M & Barja G (2000) Low fatty acid unsaturation: A mechanism for lowered lipoperoxidative modification of tissue proteins in mammalian species with long life spans. *Journals Gerontol. Ser. a-Biological Sci. Med. Sci.* 55, B286–B291.
- Pamplona R, Portero-Otin M, Riba D, Ruiz C, Prat J, Bellmunt MJ & Barja G (1998) Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum life span in mammals. *J. Lipid Res.* 39, 1989–1994.
- Pamplona R, Portero-Otin M, Ruiz C, Gredilla R, Herrero A & Barja G (1999) Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mech. Ageing Dev.* 112, 169–183.
- Pamplona R, Portero-Otin M, Sanz A, Ayala V, Vasileva E & Barja G (2005) Protein and lipid oxidative damage and complex I content are lower in the brain of budgerigar and canaries than in mice. Relation to aging rate. *Age (Omaha)*. 27, 267–280.
- Pamplona R, Portero-Otin M, Sanz A, Requena J & Barja G (2004) Modification of the longevity-related degree of fatty acid unsaturation modulates oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in liver and brain. *Exp. Gerontol.* 39, 725–733.
- Pamplona R, Prat J, Cadenas S, Rojas C, PerezCampo R, Torres ML & Barja G (1996) Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from long-lived species: The pigeon and human case. *Mech. Ageing Dev.* 86, 53–66.

- Parent GJ, Pernet F, Tremblay R, Sevigny JM & Ouellette M (2008) Remodeling of membrane lipids in gills of adult hard clam *Mercenaria mercenaria* during declining temperature. *Aquat. Biol.* 3, 101–109.
- Pernet F, Tremblay R, Comeau L & Guderley H (2007) Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: energetics and remodelling of membrane lipids. *J. Exp. Biol.* 210, 2999–3014.
- Pernet F, Tremblay R, Gionet C & Landry T (2006) Lipid remodeling in wild and selectively bred hard clams at low temperatures in relation to genetic and physiological parameters. *J. Exp. Biol.* 209, 4663–4675.
- Pernet F, Tremblay R, Redjah I, Sevigny JM & Gionet C (2008) Physiological and biochemical traits correlate with differences in growth rate and temperature adaptation among groups of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *J. Exp. Biol.* 211, 969–977.
- Philipp E, Portner HO & Abele D (2005) Mitochondrial ageing of a polar and a temperate mud clam. *Mech. Ageing Dev.* 126, 610–619.
- Philipp EER & Abele D (2009) Masters of Longevity: Lessons from Long-Lived Bivalves - A Mini-Review. *Gerontology* 56, 55–65.
- Picard M, Taivassalo T, Ritchie D, Wright KJ, Thomas MM, Romestaing C & Hepple RT (2011) Mitochondrial Structure and Function Are Disrupted by Standard Isolation Methods. *PLoS One* 6, 11.
- Pichaud N, Chatelain EH, Ballard JWO, Tanguay R, Morrow G & Blier PU (2010) Thermal sensitivity of mitochondrial metabolism in two distinct mitotypes of *Drosophila simulans*: evaluation of mitochondrial plasticity. *J. Exp. Biol.* 213, 1665–1675.
- Portero-Otin M, Bellmunt MJ, Requena JR & Pamplona R (2003) Protein modification by advanced Maillard adducts can be modulated by dietary polyunsaturated fatty acids. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1403–1405.
- Portero-Otin M, Bellmunt MJ, Ruiz MC, Barja G & Pamplona R (2001) Correlation of fatty acid unsaturation of the major liver mitochondrial phospholipid classes in mammals to their maximum life span potential. *Lipids* 36, 491–498.
- Pruitt NL (1988) Membrane lipid composition and overwintering strategy in thermally acclimated crayfish. *Am. J. Physiol.* 254, R870–876.
- Quinlan CL, Orr AL, Perevoshchikova I V, Treberg JR, Ackrell B a & Brand MD (2012) Mitochondrial Complex II Can Generate Reactive Oxygen Species at

- High Rates in Both the Forward and Reverse Reactions. *J. Biol. Chem.* 287, 27255–27264.
- Rabinovich AL & Ripatti PO (1991) The flexibility of natural hydrocarbon chains with non-methylene-interrupted double-bonds. *Chem. Phys. Lipids* 58, 185–192.
- Rasmussen HN & Rasmussen UF (2003) Oxygen solubilities of media used in electrochemical respiration measurements. *Anal. Biochem.* 319, 105–113.
- Reis RJS, Xu LL, Lee H, Chae M, Thaden JJ, Bharill P, Tazearslan C, Siegel E, Alla R, Zimniak P & Ayyadevara S (2011) Modulation of lipid biosynthesis contributes to stress resistance and longevity of *C. elegans* mutants. *Aging-Us* 3, 125–147.
- Richard WJ, Nabholz B & Galtier N (2010) An evolutionary genome scan for longevity-related natural selection in mammals. *Mol. Biol. Evol.* 27, 840–847.
- Ridgway ID & Richardson CA (2011) *Arctica islandica*: the longest lived non colonial animal known to science. *Rev. Fish Biol. Fish.* 21, 297–310.
- Ridgway ID, Richardson CA & Austad SN (2011) Maximum Shell Size, Growth Rate, and Maturation Age Correlate With Longevity in Bivalve Molluscs. *Journals Gerontol. Ser. a-Biological Sci. Med. Sci.* 66, 183–190.
- Ridgway ID, Richardson CA, Enos E, Ungvari Z, Austad SN, Philipp EER & Csiszar A (2011) New species longevity record for the Northern quahog (=Hard clam), *Mercenaria mercenaria*. *J. Shellfish Res.* 30, 35–38.
- Robert KA, Brunet-Rossinni AK & Bronikowski AM (2007) Testing the “free radical theory of aging” hypothesis: physiological differences in long-lived and short-lived colubrid snakes. *Aging Cell* 6, 395–404.
- Roddick D, Kilada R & Mombourquette K (2007) *Ocean Quahog (Arctica islandica) Survey and Yield Estimates for Sable Bank*, CSAS Res. Doc. 2007/036.
- Roddick D, Mombourquette K & Kilada R (2007) *2002 Survey for Ocean Quahogs (Arctica islandica) at the mouth of St. Marys Bay, Nova Scotia*, Can Sci Advis Sec Res Doc. 2007/037.
- Ruan H, Tang XD, Chen M-L, Joiner M-L a, Sun G, Brot N, Weissbach H, Heinemann SH, Iverson L, Wu C-F, Hoshi T, Chen M-L, Joiner M a & Heinemann SH (2002) High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2748–2753.
- Ruiz MC, Ayala V, Portero-Otin M, Requena JR, Barja G & Pamplona R (2005) Protein methionine content and MDA-lysine adducts are inversely related to

- maximum life span in the heart of mammals. *Mech. Ageing Dev.* 126, 1106–1114.
- Salway KD, Page MM, Faure PA, Burness G & Stuart JA (2011) Enhanced protein repair and recycling are not correlated with longevity in 15 vertebrate endotherm species. *Age (Dordr.)* 33, 33–47.
- Sanz A, Pamplona R & Barja G (2006) Is the mitochondrial free radical theory of aging intact? *Antioxid. Redox Signal.* 8, 582–599.
- Schafer FQ & Buettner GR (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 1191–1212.
- Schlame M, Shanske S, Doty S, König T, Sculco T, Dimauro S & Blanck TJJ (1999) Microanalysis of cardiolipin in small biopsies including skeletal muscle from patients with mitochondrial disease. *J. Lipid Res.* 40, 1585–1592.
- Sephton TW & Bryan CF (1990) Age and growth rate determinations for the Atlantic surfclam, *Spisula solidissima* (Dillwyn 1817) in Prince Edward Island, Canada. *J. Shellfish Res.* 9, 177–186.
- Sohal RS (1993) Aging, cytochrome oxidase activity, and hydrogen peroxide release by mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 14, 583–588.
- Sohal RS, Ku HH & Agarwal S (1993) Biochemical correlates of longevity in two closely-related rodent species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196, 7–11.
- Sohal RS, Sohal BH & Orr WC (1995) Mitochondrial superoxide and hydrogen-peroxide generation, protein oxidative damage, and longevity in different species of flies. *Free Radic. Biol. Med.* 19, 499–504.
- Sohal RS, Svensson I & Brunk UT (1990) Hydrogen-peroxide production by liver-mitochondria in different species. *Mech. Ageing Dev.* 53, 209–215.
- Sohal RS, Svensson I, Sohal BH & Brunk UT (1989) Superoxide anion radical production in different animal species. *Mech. Ageing Dev.* 49, 129–135.
- Speakman JR (2005) Correlations between physiology and lifespan - two widely ignored problems with comparative studies. *Aging Cell* 4, 167–175.
- Staniek K & Nohl H (2000) Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics* 1460, 268–275.

- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ & Brand MD (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* 277, 44784–44790.
- Strahl J, Brey T, Philipp EER, Thorarinsdottir G, Fischer N, Wessels W & Abele D (2011) Physiological responses to self-induced burrowing and metabolic rate depression in the ocean quahog *Arctica islandica*. *J. Exp. Biol.* 214, 4223–4233.
- Strahl J, Philipp E, Brey T, Broeg K & Abele D (2007) Physiological aging in the Icelandic population of the ocean quahog *Arctica islandica*. *Aquat. Biol.* 1, 77–83.
- Strom A (2004) North Pacific climate recorded in growth rings of geoduck clams: A new tool for paleoenvironmental reconstruction. *Geophys. Res. Lett.* 31, L06206.
- Sussarellu R, Dudognon T, Fabioux C, Soudant P, Moraga D & Kraffe E (2013) Rapid mitochondrial adjustments in response to short-term hypoxia and re-oxygenation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Biol.* 216, 1561–9.
- Taylor AC (1976) Burrowing behaviour and anaerobiosis in the bivalve *Arctica islandica* (L.). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 56, 95–109.
- Thibault M, Blier PU & Guderley H (1997) Seasonal variation of muscle metabolic organization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.* 16, 139–155.
- Tonkonogi M, Fernstrom M, Walsh B, Ji LL, Rooyackers O, Hammarqvist F, Wernerman J & Sahlin K (2003) Reduced oxidative power but unchanged antioxidative capacity in skeletal muscle from aged humans. *Pflugers Arch. J. Physiol.* 446, 261–269.
- Treberg JR, Quinlan CL & Brand MD (2010) Hydrogen peroxide efflux from muscle mitochondria underestimates matrix superoxide production--a correction using glutathione depletion. *FEBS J.* 277, 2766–78.
- Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly-Y M, Gidlof S, Oldfors A, Wibom R, Tornell J, Jacobs HT & Larsson NG (2004) Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429, 417–423.
- Tschischka K, Abele D & Portner HO (2000) Mitochondrial oxyconformity and cold adaptation in the polychaete *Nereis pelagica* and the bivalve *Arctica islandica* from the Baltic and White Seas. *J. Exp. Biol.* 203, 3355–3368.

- Turner N, Else PL & Hulbert AJ (2005) An allometric comparison of microsomal membrane lipid composition and sodium pump molecular activity in the brain of mammals and birds. *J. Exp. Biol.* 208, 371–381.
- Turner N, Else PL & Hulbert AJ (2003) Docosahexaenoic acid (DHA) content of membranes determines molecular activity of the sodium pump: implications for disease states and metabolism. *Naturwissenschaften* 90, 521–523.
- Turner N, Haga KL, Else PL & Hulbert AJ (2006) Scaling of Na⁺,K⁺-ATPase molecular activity and membrane fatty acid composition in mammalian and avian hearts. *Physiol. Biochem. Zool.* 79, 522–533.
- Ungvari Z, Ridgway I, Philipp EER, Campbell CM, McQuary P, Chow T, Coelho M, Didier ES, Gelino S, Holmbeck M a, Kim I, Levy E, Sosnowska D, Sonntag WE, Austad SN & Csiszar A (2011) Extreme longevity is associated with increased resistance to oxidative stress in *Arctica islandica*, the longest-living non-colonial animal. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 66, 741–50.
- Uribe D & Khachatourians GG (2008) Identification and characterization of an alternative oxidase in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Can. J. Microbiol.* 54, 119–127.
- Valencak TG & Ruf T (2007) N-3 polyunsaturated fatty acids impair lifespan but have no role for metabolism. *Aging Cell* 6, 15–25.
- Votyakova T V & Reynolds IJ (2004) Detection of hydrogen peroxide with Amplex Red: interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 431, 138–144.
- Wanamaker AD, Heinemeier J, Scourse JD, Richardson CA, Butler PG, Eiriksson J & Knudsen KL (2008) Very long-lived mollusks confirm 17th century AD tephra-based radiocarbon reservoir ages for North Icelandic shelf waters. *Radiocarbon* 50, 399–412.
- Weinberg J (2005) Bathymetric shift in the distribution of Atlantic surfclams: response to warmer ocean temperature. *ICES J. Mar. Sci.* 62, 1444–1453.
- Yang W & Hekimi S (2010) A mitochondrial superoxide signal triggers increased longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol.* 8, e1000556.
- Yavin E, Brand A & Green P (2002) Docosahexaenoic acid abundance in the brain: A biodevice to combat oxidative stress. *Nutr. Neurosci.* 5, 149–157.
- Zakhartsev MV, Naumenko NV & Chelomin VP (1998) Non-methylene-interrupted fatty acids in phospholipids of the membranes of the mussel *Crenomytilus grayanus*. *Russ. J. Mar. Biol.* 24, 183–186.

- Zhukova N V. (1991) The pathway of the biosynthesis of non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in molluscs. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* 100, 801–804.
- Ziuganov V, San Miguel E, Neves RJ, Longa A, Fernandez C, Amaro R, Beletsky V, Popkovitch E, Kaliuzhin S & Johnson T (2000) Life span variation of the freshwater pearl shell: A model species for testing longevity mechanisms in animals. *Ambio* 29, 102–105.